

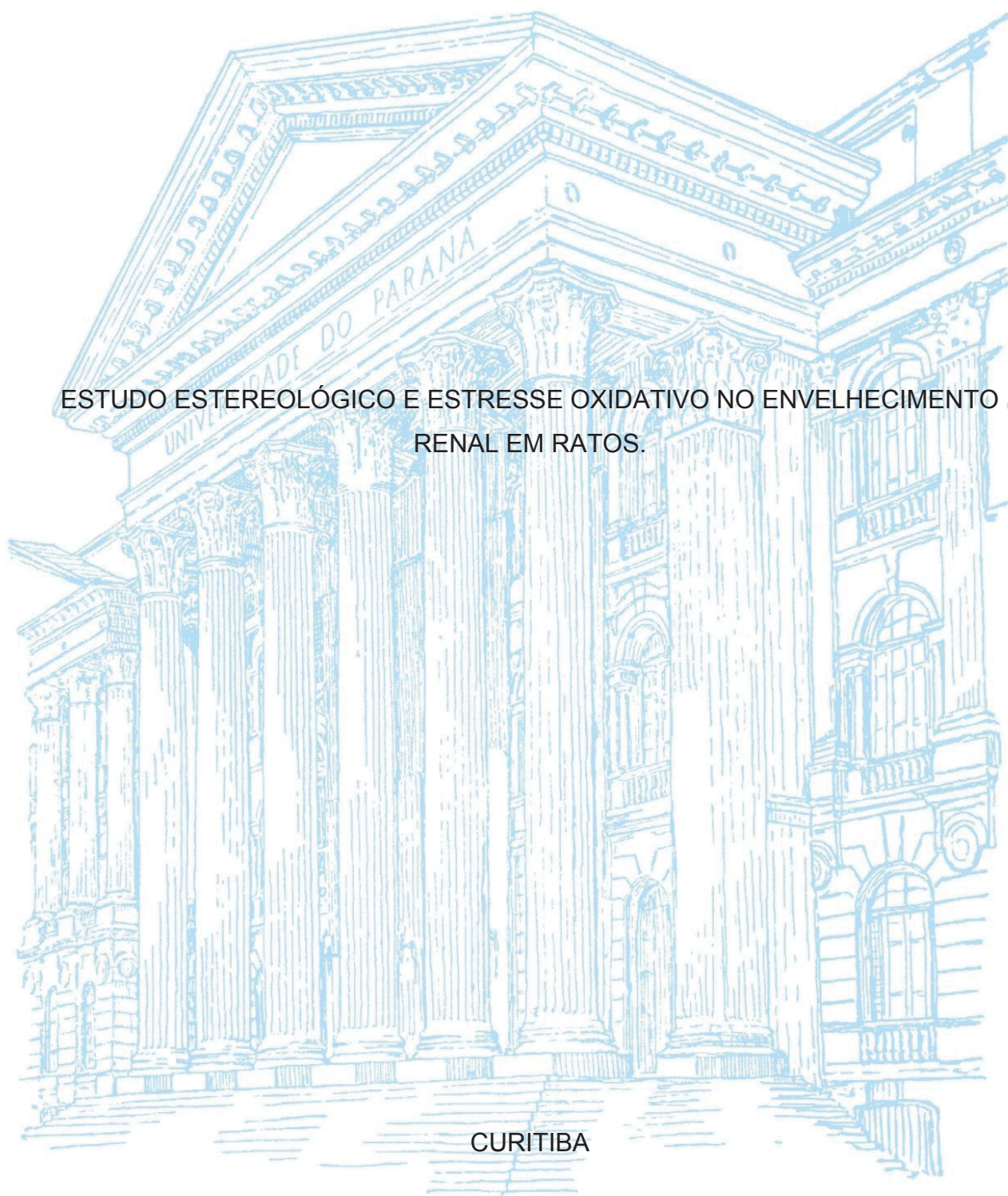
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO FELIPPE MELCHIORETTO

ESTUDO ESTEREOLÓGICO E ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO
RENAL EM RATOS.

CURITIBA

2020



EDUARDO FELIPPE MELCHIORETTO

ESTUDO ESTEREOLÓGICO E ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO
RENAL EM RATOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde
da Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em
Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga

CURITIBA

2020

M518 Melchiorretto, Eduardo Felipe

Estudo estereológico e estresse oxidativo no envelhecimento renal em ratos [recurso eletrônico] / Eduardo Felipe Melchiorretto. - Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga.

1. Ratos. 2. Envelhecimento. 3. Rim – anatomia & histologia. 4. Estresse oxidativo. 5. Fotogrametria. I. Fraga, Rogério de. II. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLMC: WJ 301

Catálogo na fonte elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFPR,
Biblioteca de Ciências da Saúde – SD, com os dados fornecidos pelo autor.
Bibliotecário: Francisco José Cordeiro CRB9/1734



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA (CLÍNICA
CIRÚRGICA) - 40001016018P0

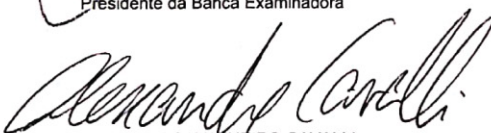
TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA (CLÍNICA CIRÚRGICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **EDUARDO FELIPPE MELCHIORETTO** intitulada: **ESTUDO ESTEREOLÓGICO E ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO RENAL EM RATOS**, sob orientação do Prof. Dr. ROGERIO DE FRAGA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 09 de Novembro de 2020.


ROGERIO DE FRAGA
Presidente da Banca Examinadora


ALEXANDRE CAVALHEIRO CAVALLI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


MARCELO ALVES ARANHA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


LUIZ SÉRGIO SANTOS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao amigo e orientador, Prof. Dr. Rogério de Fraga, pelas oportunidades, confiança e incentivo que permitiram desenvolver e concluir esse projeto. Pela paciência nos momentos difíceis e pelo brilhante espírito motivador que propiciaram acreditar que tudo vai dar certo.

Aos professores da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, pela oportunidade de participar deste programa e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo com que conduz suas atividades no desenvolvimento da pós-graduação na Universidade Federal do Paraná.

Agradeço à minha amada esposa Heloisa, pelo amor e carinho imensuráveis, suporte, compreensão, companheirismo e apoio constante.

Aos meus pais, Antônio e Dorotéia, pelos exemplos de vida, retidão, carinho e amor. Por terem fornecido toda a base sólida para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Pelo apoio nos momentos difíceis e otimismo inigualável.

A minha querida irmã Alessandra pelo companheirismo e amor desde o início.

Ao amigo e parceiro de profissão, Marcelo Zeni, pelo companheirismo e dedicação conjunta. Pela parceria constante e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, pelo exemplo desde o início de minha formação profissional e incondicional motivação na realização de pesquisas científicas. Pela disponibilização do biotério e apoio irrestrito nos cuidados com os animais.

A prof. Dra. Djanira Aparecida da Luz Veronez e ao Rodrigo Shuch pelo apoio na realização da experimentação animal e pelo auxílio na leitura dos dados estereológicos.

Ao colega e pesquisador Gustavo Lenci Marques, pelo apoio e parceria fundamentais para a realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Francisco Filipak Neto e ao Dr. Samuel Liebel pela realização das atividades laboratoriais e orientação sobre os modelos de estresse oxidativo.

Aos colegas e amigos de residência médica, Rafael Cavalheiro Cavalli, João Paulo Medeiros Guimarães, Leandro Lages, Paulo Henrique Goulart Fernandes Dias, Bruno Vinicius Duarte Neves, Mateus Cosentino Bellote, Christian Luiz Artner,

Eduardo Pereira de Miranda, Thiago Hota, Roberto Kincheski, Gino Pigatto Filho, pelo aprendizado conjunto e momentos de convivência inesquecíveis.

Agradeço a colaboração dos acadêmicos Lucas Valoni e Ingridy de Souza Digner na revisão do texto e preparação da escrita do artigo científico, sendo sempre prestativos e dispostos a ajudar.

Aos funcionários, professores e colegas da Disciplina de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo acolhimento e excelente formação técnica e humana recebida durante todos os anos de convivência.

“O começo de todas as ciências é o espanto
de as coisas serem o que são”.

Aristóteles

RESUMO

Introdução: O envelhecimento é um processo inevitável e complexo, que culmina na redução funcional de todos os órgãos e sistemas, inclusive dos rins, que são órgãos responsáveis por manter a homeostase do corpo. Embora reconhecidos os processos fisiológicos envolvidos no envelhecimento renal, os mecanismos pelos quais esses eventos ocorrem permanecem desconhecidos. **Objetivo:** Avaliar as alterações histológicas renais por estereologia e morfometria e analisar os principais marcadores de estresse oxidativo em ratos submetidos ao processo natural de envelhecimento. **Métodos:** Setenta e dois ratos Wistar divididos em seis grupos, cada grupo sacrificado em uma idade diferente: 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses. Após a nefrectomia bilateral, o rim direito foi submetido à análise estereológica e morfométrica do volume e peso renal, densidade de volume ($V_{V[glom]}$) e densidade numérica ($N_{V[glom]}$) dos glomérulos renais e análise do volume glomerular médio ($Vol_{[glom]}$). No rim esquerdo foram determinados os níveis de tióis não protéicos, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, atividade da superóxido dismutase e da enzima catalase. **Resultados:** O volume renal aumentou gradualmente durante o desenvolvimento dos ratos, com maiores valores registrados no grupo de animais aos 12 meses de idade e diminuiu progressivamente nos animais mais velhos. $V_{V[glom]}$ e $N_{V[glom]}$ apresentaram redução gradual significativa entre os grupos. A superóxido dismutase mostrou atividade aumentada no grupo de 24 meses, e os níveis de tióis não proteicos também foram maiores no grupo de animais mais velhos. A atividade da catalase e a carbonilação da proteína se mostraram mais importantes em animais entre 6 e 12 meses, com diminuição a partir dessas idades. A peroxidação lipídica foi reduzida nos grupos mais velhos de animais quando comparados aos mais jovens. **Conclusão:** As análises morfométricas e estereológicas revelaram, em associação ao envelhecimento, presença de atrofia renal, além de redução gradual da densidade de volume e densidade numérica dos glomérulos renais. Não foi encontrada hipertrofia glomerular compensatória significativa em ratos senis. De modo geral, nossos resultados não nos permitem afirmar que o estresse oxidativo é uma causa direta do envelhecimento. No entanto, as alterações encontradas podem ajudar a explicar o que ocorre no corpo ao longo do processo de senescência.

Palavras-chave: Envelhecimento. Ratos. Rim. Estresse oxidativo. Alterações histológicas. Estereologia.

ABSTRACT

Introduction: Aging is an inevitable and complex process that results in the functional decrease of most organs and systems. The kidneys are organs that maintain homeostasis in the body. Although the physiological processes involved in renal aging have already been identified, the mechanisms through which these events occur remain unknown. **Objective:** To evaluate renal histological changes by stereology and morphometry and to analyze the main markers of oxidative stress in rats under the natural aging process. **Methods:** A total of 72 Wistar rats were divided into six groups. Each group was euthanized at a different age: 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months. After a bilateral nephrectomy, the right kidney was stereologically and morphometrically analyzed (renal volume and weight) to calculate the volume density ($VV_{[glom]}$) and numerical density ($Nv_{[glom]}$) of the renal glomeruli and mean glomerular volume ($Vol_{[glom]}$). The left kidney was used to determine the levels of non-protein thiols, lipid peroxidation, and protein carbonylation, as well as the activities of the superoxide dismutase and catalase enzymes. **Results:** The renal volume gradually increased during the development of the rats, with the highest values recorded at 12 months of age, with a significantly progressive decrease in older animals. $VV_{[glom]}$ and $Nv_{[glom]}$ showed statistically significant and gradual decrease between groups. Superoxide dismutase showed increased activity in the 24 month - old group, and the levels of non-protein thiols were higher in the group of older animals. Catalase activity and protein carbonylation were more important in animals between 6 and 12 months, followed by a decrease in the older groups. Lipid peroxidation was decreased in the older groups compared to the younger groups. **Conclusion:** Morphometric and stereological analyses revealed kidney atrophy, gradual reduction in volume and numerical density of renal glomeruli associated with the aging process. No significant compensatory glomerular hypertrophy was found in senile rats. Moreover, these results do not confirm that oxidative stress is a cause of aging. However, some changes found may help explain what happens in the body during this process.

Keywords: Aging; Rats; Kidney; Oxidative stress; Histological changes; Stereology

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – MODELO DE AMOSTRAGEM EM ESTEREOLOGIA | 20 |
| FIGURA 2 – REAÇÃO DE FENTON E REAÇÃO DE HABER-WEISS | 22 |
| FIGURA 3 - REAÇÃO EM CADEIA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA | 23 |
| FIGURA 4 – REAÇÕES DA SUPEROXIDO DISMUTASE E CATALASE | 24 |
| FIGURA 5 – REAÇÕES DA GLUTATIONA PEROXIDASE | 24 |
| FIGURA 6 – AFERIÇÃO DAS MEDIDAS DO RIM DIREITO | 27 |
| FIGURA 7 – MICROSCOPIA RENAL DO RATO | 28 |
| FIGURA 8 - IMAGEM ESQUEMÁTICA DO MÉTODO <i>ORIENTATOR</i> | 28 |
| FIGURA 9 – SISTEMA-TESTE M ₄₂ SUPERPOSTO À CÓRTEX RENAL | 29 |
| FIGURA 10 – GRÁFICO DO PESO E COMPRIMENTO DOS ANIMAIS | 35 |
| FIGURA 11 – GRÁFICO DO PESO DO RIM E VOLUME DO RIM DIREITO | 36 |
| FIGURA 12 – GRÁFICO DA DENSIDADE DE VOLUME DOS GLOMÉRULOS RENAIIS | 37 |
| FIGURA 13 – GRÁFICO DA DENSIDADE NUMÉRICA DOS GLOMÉRULOS RENAIIS | 38 |
| FIGURA 14 – FOTOMICROGRAFIA DO CÓRTEX RENAL NOS GRUPOS DE 3 MESES 24 MESES | 39 |
| FIGURA 15 – GRÁFICO COM OS VALORES DO VOLUME MÉDIO DOS GLOMÉRULOS RENAIIS | 40 |
| FIGURA 16 – GRÁFICO COM VALORES DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA | 41 |
| FIGURA 17 – GRÁFICO COM VALORES DA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS | 42 |
| FIGURA 18 – GRÁFICO COM VALORES DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE | 43 |
| FIGURA 19 – GRÁFICO COM VALORES DA ATIVIDADE DA CATALASE | 43 |
| FIGURA 20 – GRÁFICO COM CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – COMPARAÇÃO ENTRE 1 ANO DE VIDA HUMANO EM DIAS PARA CADA FASE DO CICLO DE VIDA ANIMAL (RATO WISTAR) | 19 |
| TABELA 2 – GRUPOS DE ANIMAIS PELO TEMPO DE VIDA | 26 |
| TABELA 3 – RESULTADO DOS VALORES DA DENSIDADE DE VOLUME DOS GLOMÉRULOS RENAIIS | 37 |
| TABELA 4 – RESULTADO DOS VALORES DA DENSIDADE NUMÉRICA DOS GLOMÉRULOS RENAIIS | 38 |
| TABELA 5 – RESULTADO DOS VALORES DO VOLUME MÉDIO DOS GLOMÉRULOS RENAIIS | 39 |

LISTA DE SIGLAS

BHT – Butylated Hydroxytoluene (Hidroxitolueno butilado)
BSA – Albumina de Soro Bovina
CAT – Catalase
CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA – Desoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB – 5,5-ditiobis- (2-ácido nitrobenzóico)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
GESF – Glomeruloesclerose segmentar e focal
GPx – Glutathione Redutase
GSH – Glutathione Reduzida
GSSG – Glutathione Oxidada
HCl – Ácido Clorídrico
HE – Hematoxilina e eosina
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF – Insuline-like Growth Factor (Fator de Crescimento Similar a Insulina)
LPO – Peroxidação Lipídica
LSD – Least Significant Difference (Diferença Menos Significativa)
NaCl – Cloreto de Sódio
NBT – Nitroazul de Tetrazólio
Nv_[glom] – Densidade Numérica dos Glomérulos Renais
PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato-salino)
PCO – Carbonilação Proteica
SOD – Superóxido Dismutase
TGF – Taxa de filtração glomerular
Vol_[glom] – Volume Médio dos Glomérulos Renais
Vv_[glom] – Densidade Volumétrica dos Glomérulos Renais

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 OBJETIVOS | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 2.1 ENVELHECIMENTO | 16 |
| 2.2 MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS SOBRE O ENVELHECIMENTO | 18 |
| 2.3 ESTEREOLOGIA | 19 |
| 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO | 21 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 3.1 GRUPOS | 25 |
| 3.2 EXPERIMENTAÇÃO | 26 |
| 3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLOGICA DOS RINS | 27 |
| 3.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO TECIDUAL | 30 |
| 3.4.1 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA | 31 |
| 3.4.2 AVALIAÇÃO DA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS | 31 |
| 3.4.3 DOSAGEM DA GLUTATIONA E OUTROS TIÓIS | 32 |
| 3.4.4 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE | 32 |
| 3.4.5 ATIVIDADE DA CATALASE | 33 |
| 3.5 METODOLOGIA ESTATÍSTICA | 33 |
| 4 RESULTADOS | 35 |
| 4.1 ANIMAIS | 35 |
| 4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA RENAL | 35 |
| 4.3 ANÁLISE ESTEREOLOGICA | 36 |
| 4.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO TECIDUAL | 40 |
| 4.4.1 MARCADORES DE DANO OXIDATIVO | 40 |
| 4.4.2 FATORES ANTI-OXIDANTES | 42 |
| 5 DISCUSSÃO | 44 |
| 6 CONCLUSÃO | 48 |
| REFERÊNCIAS | 49 |
| DOCUMENTOS CONSULTADOS | 57 |
| APÊNDICES | 58 |
| ANEXOS | 70 |

1 INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento demográfico é um fenômeno mundial. Nos países desenvolvidos, esse processo ocorreu lentamente num contexto de prosperidade econômica, melhora dos níveis de bem-estar e redução das desigualdades sociais (MOREIRA, 1998).

Atualmente, nos países em desenvolvimento, o envelhecimento passou a ganhar maior importância devido ao crescimento acelerado da população acima de sessenta anos em relação à população geral. Nos países da América Latina são esperados aumentos de até 300% da população idosa (TRUELSON, 2001). No Brasil, o número de idosos (> 60 anos de idade) passou de três milhões em 1960 para sete milhões em 1975 e 14 milhões em 2002. Após este aumento de 500% em quarenta anos, ainda se estima que alcance 32 milhões em 2020 (LIMA-COSTA, 2003; IBGE, 2018). Este fenômeno leva a importantes repercussões econômicas, sociais e de cuidados com a saúde.

O processo de envelhecimento é inevitável e resulta na piora funcional de múltiplos sistemas, além do aumento da morbidade e mortalidade (HAYFLICK, 1998). Considerando os efeitos deste processo nos rins, percebe-se que as repercussões envolvem a presença de esclerose progressiva, ligada a um número menor de néfrons funcionantes, resultando na redução do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular (JASSAL; OREOPOULOS, 1998). Em indivíduos com comorbidades, este quadro se acentua, podendo levar ao desenvolvimento de insuficiência renal crônica.

A prevalência de doentes renais crônicos tem aumentado progressivamente, e em proporções endêmicas, no Brasil e no mundo (SESSO; GORDAN, 2007). Este cenário tem motivando grande preocupação de entidades governamentais, principalmente devido ao elevado custo previsto para manter grande parte destes pacientes em tratamentos renais substitutivos.

Visando a compreensão deste desafio para a saúde global, é essencial o entendimento sobre as variabilidades estruturais que ocorrem nos rins com o envelhecimento. Neste contexto, as mudanças morfológicas, apesar de estarem relacionadas a fatores genéticos e hemodinâmicos, não são completamente conhecidas. Além disso, tendem a ser inespecíficas, podendo ser identificadas em diversas condições, incluindo diabetes, hipertensão e arteriosclerose (PANNARALE, 2010). A utilização da estereologia aumenta a acurácia ao analisar órgãos na busca

pela identificação de tais alterações. Este método permite a obtenção de dados quantitativos, com mínimo viés, através da análise de amostras sistemáticas, uniformes e aleatórias (BERTRAM, 1995).

O estresse oxidativo pode estar relacionado a danos em diversos níveis tais como mutagênese, carcinogênese, lipoperoxidação e a oxidação e fragmentação de proteínas e carboidratos (WARNER, 1994). Dessa forma, pode ter um papel importante no processo de envelhecimento. Ou seja, para garantir uma avaliação ampliada das alterações renais, é necessário enfoque sobre as espécies químicas na forma de radicais livres centradas no oxigênio, que são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs). A geração das EROs é decorrente de reduções univalentes subsequentes do oxigênio durante a respiração aeróbia. Desta maneira, todas as formas de vida que utilizam este processo estão sujeitas aos efeitos oxidantes dos metabólitos reativos do oxigênio (WARNER, 1994). Estresse oxidativo descreve uma condição com níveis mais elevados de EROs, que resulta no desequilíbrio entre as defesas celulares antioxidantes e os mecanismos desencadeadores da condição oxidante.

Vários estudos de biomonitoramento relacionam o aporte de diversas classes de poluentes com a geração de EROs, destacando inúmeras consequências aos organismos aquáticos e aos seus respectivos ecossistemas. O estresse oxidativo gera compostos que iniciam uma série de reações em cadeia envolvendo radicais livres, e estes podem oxidar uma grande variedade de moléculas biológicas.

A oxidação dos ácidos graxos da membrana leva à destruição de seus fosfolipídios e perda de sua estrutura funcional, fluidez e função original. Nas proteínas, pode ocorrer o aparecimento de grupos carbonilas, tornando-as hidrofóbicas e resistentes à proteólise. Quanto ao material genético, as reações oxidativas podem levar à oxidação da estrutura macromolecular do DNA ou do citoesqueleto, bem como interferir na dinâmica da rede de microtúbulos do fuso mitótico, podendo gerar efeitos genotóxicos.

São várias as enzimas que têm sua atividade afetada devido à presença das espécies reativas de oxigênio, seja no sentido de auxiliar na detoxificação celular, ou para proteger a célula dessas espécies reativas. Dentre elas estão a Catalase (CAT), a Glutathione-S-transferase (GST), Glutathione Reduzida (GSH), a Glutathione Peroxidase (GPx) e a Superóxido Dismutase (SOD). É frequentemente utilizado a

aferição dos níveis de tióis não proteicos no lugar da análise apenas da glutathiona (visto que a glutathiona é o principal tiol não proteico).

Os níveis de tióis são indicativos do estado redox (estado oxidoreduutivo) da célula, e são monitorizados pelos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

São poucos os estudos que avaliam as alterações estruturais renais secundárias ao processo de envelhecimento com o auxílio da estereologia e também há poucas informações científicas sobre os danos renais decorrentes do estresse oxidativo durante o envelhecimento. O modelo utilizado no presente experimento permite analisar os efeitos do envelhecimento, minimizando a interferência de outras condições, e permitindo a possibilidade de monitorização contínua das modificações morfológicas.

1.1 OBJETIVOS

Esse trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1. Avaliar as alterações da morfometria renal e sua composição morfológica glomerular utilizando método de estereologia durante o processo de envelhecimento dos animais.
2. Avaliar como ocorre a variação de marcadores do dano oxidativo, representados pela peroxidação lipídica e carbonilação proteica, ao longo da vida do animal.
3. Avaliar como ocorre a variação das principais defesas do organismo contra o dano oxidativo na vida do animal, representados pelo nível de Tióis não-proteicos e pela atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento trata-se de um processo natural e inevitável, caracterizado pelo gradual declínio da função celular e por progressivas mudanças estruturais dos órgãos componentes dos diversos sistemas do indivíduo (KÜCHEMANN, 2012). A incapacidade do organismo em manter processos renovadores soma-se a essa condição, ocasionando aumento da morbidade e mortalidade (HAYFLICK, 1998).

Há mais de dois séculos formulam-se teorias para explicar o processo de envelhecimento celular e do organismo como um todo. Inúmeras dúvidas acerca do processo de senescência permanecem até os dias de hoje, no entanto muitos processos biológicos relacionados foram elucidados com auxílio das teorias modernas (DAVIDOVIC, 2010). Elas podem ser divididas em dois grandes grupos: as teorias do envelhecimento programado e as teorias do dano acumulado (JIN, 2010).

A ideia de que o processo de senescência é condicionado por condições internas do organismo embasa as teorias do envelhecimento programado. A teoria da longevidade programada, uma das linhas de pesquisa desse grupo, aponta correlações entre o material genético e a longevidade menor ou maior do indivíduo (DAVIDOVIC, 2010). A teoria endócrina conecta o envelhecimento às variações hormonais presentes em idades mais avançadas, abordando alterações como as que ocorrem na pós-menopausa e as relacionadas a via do Insulin-Growth Factor-1 (IGF1) (VAN HEEMST, 2010). Ainda, há a teoria imune, sustentada pelo enfraquecimento do sistema imunológico, relacionando-o a maior suscetibilidade a infecções e a evolução de neoplasias malignas, de doenças cardiovasculares e do mal de Alzheimer (EIKELENBOOM, 2008).

As teorias do dano acumulado explicam o envelhecimento como o resultado de contínuas ações negativas sobre o organismo. Dentre elas há a teoria do desgaste, embasada na exposição repetida a fatores externos agressores, como a exposição solar (JIN, 2010). Outra teoria desse grande grupo apoia-se nos danos ao DNA, resultantes de falhas no processo de divisão celular sem devido reparo; eles acumulam-se progressivamente e levam a disfunção celular (GARINIS, 2008). A teoria dos radicais livres de oxigênio, por sua vez, explica-se pelos danos oxidativos gerados na respiração celular associados ao desequilíbrio de fatores antioxidantes. Desse

modo, os danos oxidativos acumulam-se com o tempo e afetam moléculas como DNA, proteínas e lipídios; no fim do processo ocorre falência funcional da célula e morte da mesma (RIKANS, 1997; CUI, 2011).

Destaca-se que o processo de envelhecimento da população humana é um fenômeno mundial. O declínio das taxas de natalidade e o aumento da taxa de expectativa de vida explicam essa condição, que por sua vez resulta em alteração do perfil populacional e da pirâmide etária global (VERAS, 2009). Nos países desenvolvidos, esse processo ocorreu lentamente numa situação de evolução econômica, de crescimento do nível de bem-estar e redução das desigualdades sociais (MOREIRA, 1998). Entretanto, nos países em desenvolvimento o envelhecimento vem caracterizando-se como um processo mais acelerado, responsável por uma progressiva mudança na proporção entre a população acima de sessenta anos e a população geral (TRUELSEN, 2001).

No Brasil, o número de idosos com 65 anos de idade ou mais é de 19,2 milhões em 2018 (9,2% da população). Estima-se 58,2 milhões de idosos nessa faixa etária para 2060, valor que corresponderia a 25,5% da população (IBGE, 2018). Ou seja, trata-se de um envelhecimento populacional ainda em curso e significativo, a despeito da mudança demográfica já ocorrida nos últimos 50 anos. Trata-se de um importante fenômeno, com repercussões econômicas, sociais e de cuidados com a saúde.

Os rins acompanham o envelhecimento do organismo como um todo, entretanto a senescência desses órgãos também possui características particulares. Estudos evidenciam alterações funcionais, relacionados à taxa de filtração glomerular (TFG), permeabilidade de grandes solutos, excreção e conservação de água, homeostase de cloreto de sódio, equilíbrio ácido-base, atividade hormonal e controle da pressão sanguínea (GLASSOCK, 2016).

O aspecto mais largamente estudado é a taxa de filtração glomerular (TFG), dado que corresponde ao produto do número de néfrons funcionais e da TFG média de cada néfron individualmente. O indivíduo nasce com um número definido de néfrons, sendo incapaz de produzir novos ao longo de sua existência, ocorrendo apenas reduções desse valor durante o passar do tempo (GLASSOCK, 2016).

O estudo de Denic, publicado em 2017, demonstrou que um adulto médio de 18-29 anos de idade tem cerca de 1.008.000 glomérulos por rim, sendo que 991.000 são funcionantes e 17.000 já foram submetidos a um processo de cicatrização, conhecido como glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) (DENIC, 2017). Por

outro lado, um indivíduo de 70-75 anos possui em média 660.000 glomérulos em cada, sendo 520.400 funcionantes e 142.000 que sofreram GESF. Outros estudos evidenciam resultados semelhantes, estimando uma redução de 35% do número absoluto de néfrons em cada rim pelo envelhecimento, considerando tanto néfrons não-escleróticos como escleróticos, devido aos processos de atrofia e esclerose (CHEVALIER, 2008).

Os mecanismos responsáveis pela perda de néfrons ainda não são totalmente compreendidos, no entanto algumas condições marcadamente acompanham o envelhecimento renal. A fibrose intersticial é uma delas, sendo proporcional à gravidade da GESF, e também ocorre hipertrofia tubular, responsável por atenuar um pouco a perda de volume cortical encontrada no envelhecimento dos rins (DENIC, 2017; DENIC, 2016). A senescência renal relaciona-se também a fatores genéticos e hemodinâmicos pouco compreendidos. Eles são responsáveis por alterações estruturais inespecíficas, encontradas também na hipertensão arterial sistêmica (HAS), na arteriosclerose e no diabetes (PANNARALE, 2010).

2.2 MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS SOBRE O ENVELHECIMENTO

Com intuito de preservar o ser humano, o uso de modelos animais em experimentações vem sendo amplamente difundido desde o início do século XX. (VAN ZUTPHEN, 2002). Quando falamos em pesquisas sobre envelhecimento e longevidade esse modelo torna-se ainda mais importante, pois assim conseguimos observar todo o ciclo de vida em um período mais curto de tempo e controlar a exposição ambiental durante toda a vida do animal.

Dentre os modelos animais que já foram utilizados o mais simples é o de moscas do gênero *Drosophila*, por possuírem um ciclo de vida extremamente curto e se reproduzirem rapidamente, no entanto, apresentam menor replicabilidade em seres humanos. Já o uso de primatas como modelo traz maior similaridade com humanos, mas, possuem um ciclo de vida extenso e os estudos precisam ser mais longos. Entre esses extremos temos o uso de roedores, que, por serem mamíferos, apresentam ciclo de vida estruturado de forma similar ao humano, mas muito mais curto.

No entanto, um erro comumente cometido é tentar fazer uma relação direta entre a idade do animal com a de um ser humano, fazendo uma conta simples baseada na expectativa de vida para dizer quanto um ano da vida humana

corresponderia para aquele animal. Essa correlação não é linear, uma vez que toda a fisiologia e o ciclo de vida são diferentes entre as espécies. Tomando como exemplo os ratos da raça Wistar em relação aos humanos, eles possuem, proporcionalmente, um período pré-puberal extremamente curto e um período reprodutivo longo (SENGUPTA, 2013).

Por este motivo, fórmulas foram propostas para realizar uma adaptação, realizando uma conta de equivalência para cada fase do ciclo de vida, como exemplificado na (TABELA 1) (QUINN, 2005).

TABELA 1 – COMPARAÇÃO ENTRE 1 ANO DE VIDA HUMANO EM DIAS PARA CADA FASE DO CICLO DE VIDA ANIMAL (RATO WISTAR).

| Fase do Ciclo de Vida | Tempo de equivalência a 1 ano de vida humano |
|------------------------------|---|
| Período Neonatal | 42,4 Dias |
| Período Pré Puberal | 4,3 Dias |
| Adolescência | 10,5 Dias |
| Idade Adulta | 11,8 Dias |
| Senescência | 17,1 Dias |

FONTE: adaptado de Sengupta (2013)

Podemos considerar que um animal é idoso quando sua capacidade reprodutiva é reduzida, o que ocorre entre 15 e 20 meses para os animais da raça Wistar (SENGUPTA, 2013). A partir dessas informações desenhemos o modelo animal deste estudo.

2.3 ESTEREOLOGIA

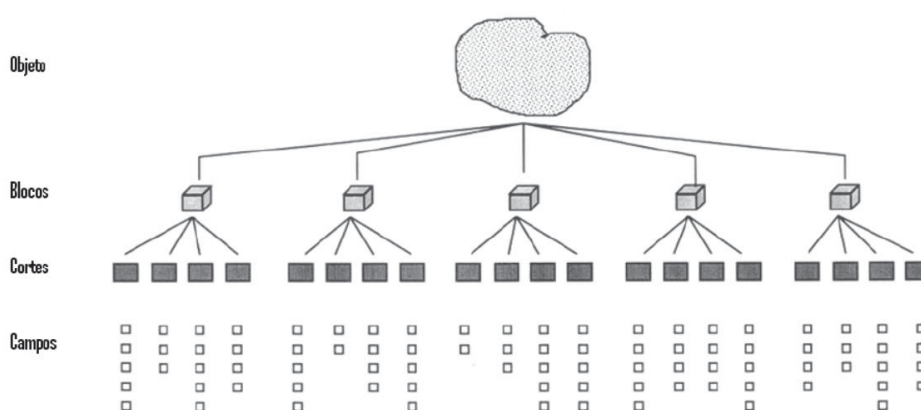
A estereologia, é uma área do conhecimento, modernamente definida como “a ciência da interpretação espacial de secções”, que utiliza a aplicação da geometria probabilística em amostras randômicas e sistemáticas obtidas através de planos bidimensionais de uma determinada imagem ou corpo sólido para fornecer, após análise, informações capazes de interpretar em três dimensões (comprimento, largura e profundidade) aquela estrutura (GUNDERSEN, 1988; INTERNATIONAL STEREOLOGY SOCIETY, 2020).

Em 1847, surgem os preceitos da estereologia através das descrições do geólogo francês Achille Ernest Delesse que formulou o princípio de que a densidade de volume dos componentes de uma rocha é igual a densidade de área destes componentes avaliadas em cortes representativos feitos ao acaso (princípio de Delesse).

A partir da primeira metade do século XX, esta ciência passou a ser mais amplamente utilizada na área médica e, a partir da segunda metade do século XX e do surgimento da Sociedade Internacional de Estereologia, os princípios básicos foram se consolidando e sendo difundidos, principalmente no aperfeiçoamento dos métodos de amostragem (GUNDERSEN, 1988; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

As medidas estereológicas só são válidas se as amostras do tecido forem obtidas randomicamente e de forma representativa (FIGURA 1).

FIGURA 1- MODELO DE AMOSTRAGEM EM ESTEREOLOGIA



FONTE: Adaptado de MANDARIM-DE-LACERDA (2003).

Além do princípio de Delesse que estima a proporcionalidade de elementos de uma amostra, o método da estereologia fundamenta-se em algumas outras premissas. Para a quantificação do volume absoluto de um objeto, pode-se utilizar a técnica proposta por Cavalieri, no século XVII, que afirma que o volume de qualquer objeto pode ser estimado cortando-se o mesmo em fatias separadas por uma distância conhecida e calculando-se a área de secção transversa de cada fatia; desta forma, o volume do objeto será dado pela soma das áreas de todas as fatias multiplicado pela espessura (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Para a avaliação do número de estruturas, é necessário a utilização de método capaz de impedir a superestimação do número de elementos na secção (efeito

Holmes). Classicamente, usa-se o método *Physical Disector* publicado por Sterio (1984), que é um sistema de amostragem tridimensional que avalia objetos proporcionalmente a seu número em um determinado volume conhecido, sem levar em conta seu tamanho ou forma (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Toda análise estereológica, a fim de evitar vieses de amostragem, deve objetivar inicialmente obter uma secção ou corte aleatório e uniformemente isotrópico (AUI). Após, o corte deve ser analisado frente a um sistema-teste pré-definido de pontos, retas e intersecções para obtenção das informações da secção. O Sistema M₄₂ é um sistema-teste frequentemente utilizado e é sobreposto às lâminas para contagem das estruturas interessadas (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE, 1966).

Vários estudos, na atualidade, têm utilizado a estereologia para a avaliação das alterações das estruturas renais (NYENGAARD JR, 1999). Pesquisas relacionadas às modificações renais no desenvolvimento embrionário (CATTAPRETA, 2006), estudos sobre os efeitos das doenças crônicas sobre o tecido renal, como diabetes (MEDEIROS; AGUILA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2006) e hipertensão (WINTOUR, 2003), e também exposição a agentes específicos como dieta (AGUILA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003) e ambiente (CASOTTI, 2001), hormônios (ZEIER, 1998) e algumas drogas (DRAGAN, 1995; CIBULSKYTE, 2007; DICKINSON, 2007) são exemplos da importância crescente da estereologia nas pesquisas médicas.

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

A utilização do oxigênio para geração de energia, ou metabolismo aeróbio trouxe como ônus o desenvolvimento de produtos potencialmente tóxicos: os oxidantes ou Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (SIES, 1991).

É estimado que 3 a 5% de todo oxigênio envolvido no processo de respiração celular gere algum tipo de radical livre de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

As EROs são parte de uma gama maior de subprodutos do metabolismo conhecidas como Radicais Livres. Estes são denominados pelo fato de poderem existir independentemente e apresentarem um ou mais elétrons desemparelhados (BARBER; BERNHEIM, 1967; CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979).

Dentre todos os radicais livres de oxigênio três se destacam, o ânion superóxido (O_2^-), o radical Hidroxila (OH^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O

primeiro tem grande importância por ser o radical mais abundante na célula e por ser o mais estável. Já o segundo é extremamente instável, tem meia-vida muito curta, mas é o mais nocivo às células, pois não há uma via enzimática no organismo que atue diretamente contra esse ânion. O peróxido de hidrogênio não pode ser conceituado como uma ERO, mas tem sua importância pela grande capacidade em gerar radicais livres e por poder atuar como sinalizador celular.

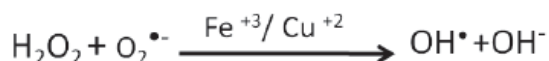
Existe ainda a possibilidade de conversão de um radical em outro. O ânion superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) que por sua vez pode reagir com metais e gerar a radical hidroxila nas reações descritas por Fenton e Haber-Weiss, como pode ser observado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - A) REAÇÃO DE FENTON, REAÇÃO DO PEROXIDO DE HIDROGÊNIO COM FERRO OU COBRE GERANDO O RADICAL HIDROXILA. B) REAÇÃO DE HABER-WEISS, PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO REAGINDO COM O ÂNION SUPERÓXIDO, MEDIADA POR FERRO OU COBRE, GERANDO O RADICAL HIDROXILA

A) Reação de Fenton:



B) Reação de Haber - Weiss



FONTE: Adaptado de Halliwell e Gutteridge (2015).

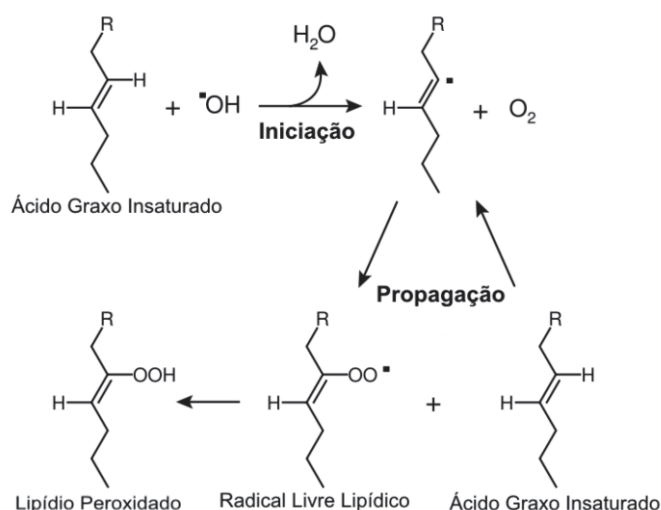
Podem existir, além das EROs, as espécies reativas de Nitrogênio. Todas estas moléculas têm como principal característica a capacidade de transportar elétrons durante as reações de geração de energia na célula.

Diversas estruturas celulares, tais como lipídios de membrana, DNA e proteínas celulares, podem reagir com esses radicais. Ao reagirem com os ácidos graxos insaturados da membrana celular geram um lipídio altamente reativo, que ao reagir com outro ácido graxo insaturado produz um aldeído ou lipídio peroxidado e um novo radical livre lipídico, propagando o fenômeno por meio de uma reação em cadeia que só é interrompida quando não há mais ácidos graxos insaturados para reagir ou quando algum sistema antioxidante age, como exemplificado na FIGURA 3 (ABDALLA; SENA, 2008). Quando reagem com aminoácidos da cadeia lateral das proteínas levam a um processo conhecido como carbonilação proteica, gerando

alterações nas funções dessas proteínas, o mecanismo biológico dessa reação é complexo e ainda não bem compreendido (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010). Quando reagem com o DNA podem gerar alterações diretamente nas bases nitrogenadas ou alterar a ligação entre elas, levando a mutações no material genético (NÚÑEZ; HALL; BARTON, 1999).

Assim sendo, a peroxidação lipídica é um importante marcador do dano oxidativo à parede celular, podendo indicar o grau de disfunção celular. Já a carbonilação proteica indica um grau elevado de falência intracelular, podendo ser o marcador de algumas doenças. A Carbonilação de Proteínas (PCO) é o biomarcador mais amplamente utilizado para identificar dano proteico por estresse oxidativo, e reflete o dano celular causado por múltiplas EROs (DALLE- DONNE et al., 2006).

FIGURA 3 - REAÇÃO EM CADEIA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA



FONTE: Adaptado de Halliwell e Gutteridge (2015).

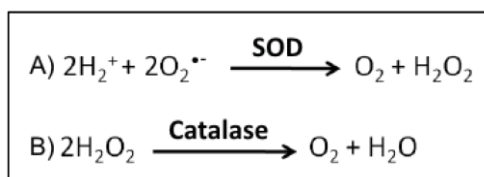
Para contrabalancear estes compostos reativos e manter a homeostase celular, existem sistemas antioxidantes que agem de forma a neutralizar total ou parcialmente os radicais livres. Estes sistemas podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, e atuam reagindo com os compostos oxidantes, absorvendo os elétrons livres e modificando as moléculas reativas (BARBOSA et al., 2010).

Existem formas de defesa contra esses danos, que incluem agentes antioxidantes como a vitamina A e C, os flavonoides, o ácido úrico, além de vias enzimáticas intrínsecas da célula. Dentre essas vias enzimáticas destacam-se três, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A

catalase, nos peroxissomos, realiza uma reação de transformação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, complementando a reação já descrita para a SOD (conversão de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2), como representado na FIGURA 4.

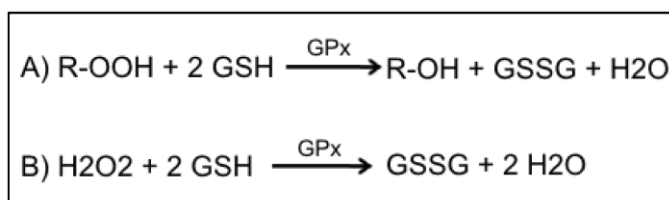
A Glutathione Peroxidase, utiliza a Glutathione reduzida (GSH) - peptídeo intracelular da classe dos tióis - como cofator e reage com peróxidos transformando-os em álcool ou em água quando reage com o peróxido de hidrogênio (FIGURA 5). A Glutathione reduzida (GSH) atua principalmente nas reações de oxi-redução, pela sua facilidade em doar elétrons e neutralizar as EROs, possuindo papel central na biotransformação e eliminação dos xenobióticos e é considerada fundamental na adaptação e evolução das espécies devido a este papel detoxificador (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008).

FIGURA 4 - A) CONVERSÃO DO RADICAL SUPERÓXIDO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E OXIGÊNIO, MEDIADA PELA SOD. B) CONVERSÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM OXIGÊNIO E ÁGUA



FONTE: adaptado de Halliwell e Gutteridge (2015).

FIGURA 5 - A) REAÇÃO DE UM PERÓXIDO COM A GSH, MEDIADA PELA GPX, GERANDO UM ÁLCOOL, ÁGUA E GLUTATHIONE OXIDADA. B) REAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COM A GSH, MEDIADA TAMBÉM PELA GPX, GERANDO 2 MOLÉCULAS DE ÁGUA E GLUTATHIONE OXIDADA



FONTE: adaptado de Halliwell e Gutteridge (2015).

Envelhecimento, drogas ou agentes xenobióticos podem interferir com os mecanismos de oxi-redução, gerando estresse oxidativo. Os mecanismos principais são pela atuação destes agentes a nível mitocondrial, interferindo com o transporte

de elétrons, e alterando o funcionamento enzimático, em especial do Citocromo P450 e CYP3A4 (que são importantes agentes oxidantes) (RAY; HUANG; TSUJI, 2012).

Assim, o estresse oxidativo se caracteriza pelo excesso de EROs em decorrência de um desequilíbrio nos mecanismos de oxi-redução, conduzindo a um processo de oxidação de biomoléculas, como proteínas, lipídios, DNA, e gerando quebra da homeostasia celular e dano potencial às células e tecidos (WARNER, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste estudo, os conceitos de ética em experimentação animal foram considerados, seguindo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), além das exigências estabelecidas pelo “Guide for the Care and Use of Experimental Animals” (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1993).

O experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná na 7ª Reunião Ordinária do CEEA de 2010 (17/08/2010, certificado 463) sob o processo número 23075.032620/2010-10.

3.1 GRUPOS

Para o estudo, foram utilizados 72 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), do sexo masculino. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno com medidas de 60X50X22cm devidamente identificadas com o título do estudo e a data de nascimento do animal, distribuídos em 3 por gaiola. Foram submetidos a uma temperatura controlada em 22 graus Celsius, respeitando ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, com umidade do ar controlada e livre de ruídos externos. Receberam água filtrada e ração específica para a espécie Nuvilab (Nuvital® – Colombo, Paraná, Brasil) de forma ad libitum durante todo o período do experimento (NEVES et al., 2013).

Foram formados seis grupos, cada um contendo 12 ratos, que foram sacrificados conforme a etapa cronológica de vida (TABELA 2).

TABELA 2 – SUBDIVISÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS PELO TEMPO DE VIDA.

| GRUPO | TEMPO DE VIDA |
|--------------|----------------------|
| 1 | 3 meses |
| 2 | 6 meses |
| 3 | 9 meses |
| 4 | 12 meses |
| 5 | 18 meses |
| 6 | 24 meses |

FONTE: o autor (2020).

3.2 EXPERIMENTAÇÃO

Os animais que seriam submetidos ao procedimento eram alocados em uma sala longe do sítio de experimentação, em um local calmo e sem ruídos externos, e então levados um a um em uma gaiola de transporte para o laboratório.

Na sala de experimentação era realizada pesagem em balança calibrada ultrassensível e medição da estatura do animal com paquímetro digital.

Para a realização do procedimento, os animais foram submetidos a anestesia com solução de Cloridrato de Cetamina (57,67mg/ml) associado a 2% de Cloridrato de Xilazina (2g), com aplicação de 1ml/1000 gramas de peso vivo, via intraperitoneal. Após anestesiados, os animais foram fixados em tábua cirúrgica com fita adesiva e submetidos a antisepsia abdominal e torácica. O procedimento consistiu na realização de laparotomia e toracotomia mediana. Para indução de parada cardiorrespiratória, foi realizada punção intra-cardíaca, com remoção de volume até atingir estado fatal de hipovolemia.

A seguir, procedeu-se a dissecação dos rins bilateralmente, ligadura dos vasos renais e dos ureteres e realização de nefrectomia bilateral. O rim esquerdo foi imediatamente congelado num freezer de temperatura de -80°C e o rim direito foi submetido a pesagem em balança eletrônica de alta precisão (Ohaus Precision Standard – modelo TS-2KS, Bradford, Inglaterra). A aferição de comprimento, largura e espessura foi realizada utilizando paquímetro digital Digimess®, sendo registrados os dados para posterior análise (FIGURA 6).

FIGURA 6 - AFERIÇÃO DAS MEDIDAS DO RIM DIREITO COM PAQUÍMETRO DIGITAL



FONTE: o autor (2013).

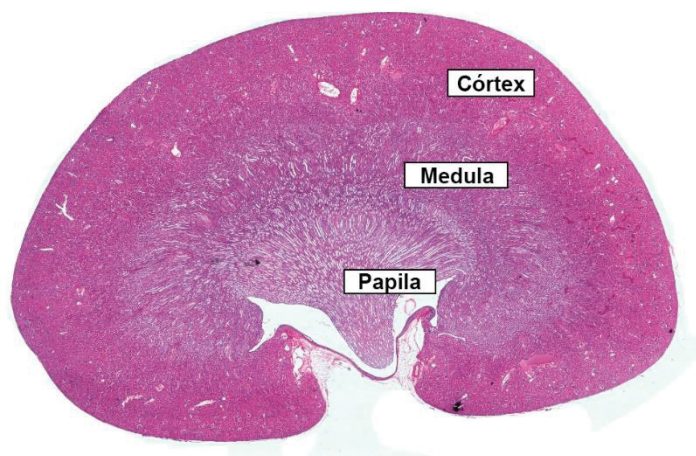
Foram também ressecados, para realização de outros estudos sobre o processo de envelhecimento, os seguintes órgãos: testículos, bexiga, corpos cavernosos e uretra, aorta, coração, fígado e cérebro.

3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DOS RINS

Considerando o padrão elipsóide do rim, o volume foi calculado a partir da fórmula recomendada por Barr (1990): $\text{Volume} = \text{Comprimento} \times \text{Largura} \times \text{Espessura} \times 0,523$ (SAMPAIO; ARAÚJO, 2002).

Após a aferição das medidas de peso, comprimento, largura e espessura, o rim direito foi submetido a fixação em ALFAC (85 partes de álcool etílico 80%, 10 partes de formaldeído 40% e 5 partes de ácido acético glacial, preparado no momento do uso) por 16 horas. Após este passo, o material foi desidratado em uma série progressivamente menor de xilol e álcoois, para posterior inclusão em blocos de parafina (FIGURA 7).

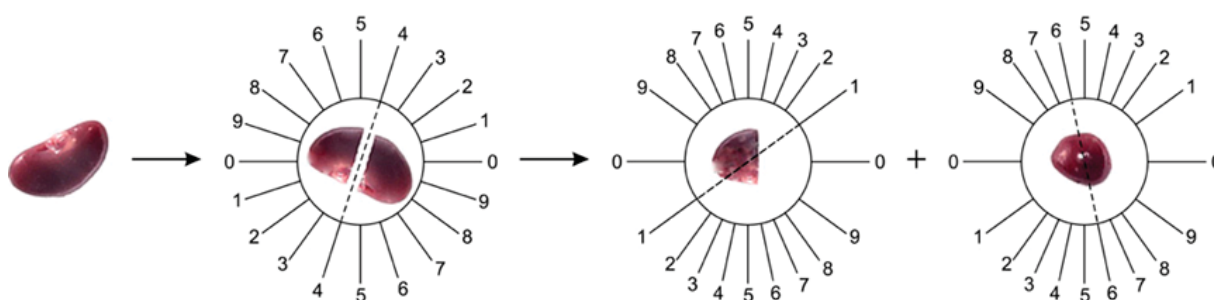
FIGURA 7 – MICROSCOPIA RENAL DO RATO. OBSERVAR QUE O PARÊNQUIMA RENAL POSSUI UMA ÚNICA PIRÂMIDE E CONSEQUENTEMENTE UMA ÚNICA PAPILA.



FONTE: o autor (2015).

Em seguida, os rins foram submetidos aos cortes sucessivos em micrótomo com 7 μ m de espessura (American Optical, Spencer AO 820). Como a porção cortical do rim concentra a maior parte dos glomérulos, o órgão é considerado anisotrópico. Por isso, foi utilizado o método do *Orientator* (FIGURA 8) (MATTFELDT et al., 1990) para obtenção de cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (cortes AUI).

FIGURA 8 - IMAGEM ESQUEMÁTICA DO MÉTODO *ORIENTATOR* PARA A OBTENÇÃO DE CORTES ALEATÓRIOS E UNIFORMEMENTE ISOTRÓPICOS



FONTE: Adaptado de Karbalay-Doust et al (2012).

Para mensurar a densidade numérica dos glomérulos (Nv[glom]), foi utilizado o método *Physical Disector* (STERIO, 1984). A amostragem do tecido renal foi realizada com dois cortes consecutivos; selecionados 1 a cada 5 cortes – representando uma espessura de 35 micrômetros entre os planos – para a determinação dos parâmetros quantitativos tridimensionais dos glomérulos renais a partir de cortes bidimensionais.

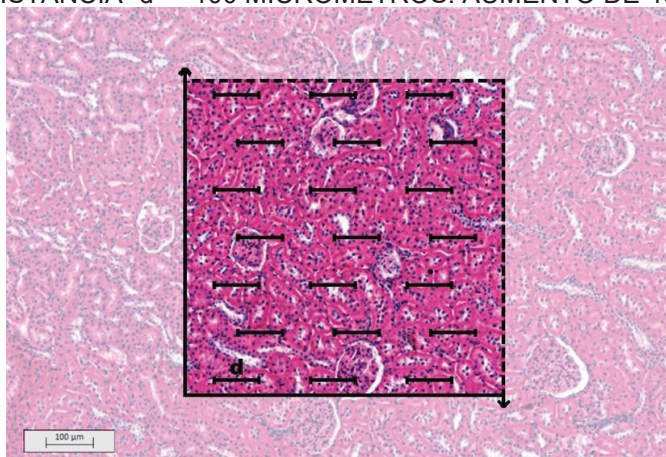
Posteriormente, as lâminas histológicas foram montadas com 5 cortes de cada unidade renal para a execução da técnica histoquímica Hematoxilina & Eosina (HE).

Para coloração de HE seguimos o protocolo clássico com algumas adaptações. As lâminas foram colocadas, por um minuto, em solução Hematoxilina Harris. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada duas vezes consecutivas. Em seguida, foram impregnadas com Eosina-Floxina por 45 segundos. Esse material foi imediatamente lavado com água destilada para em seguida ser desparafinado, desidratado e montado (JUNQUEIRA, LC; JUNQUEIRA, LMMS, 1983; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

A análise das lâminas submetidas a coloração de HE foi feita em microscópio biológico trinocular com objetivas planas BEL PHOTONICS modelo BIO2 Polaris (BEL PHOTONICS DO BRASIL LTDA, São Paulo, Brasil) com sistema de captura de imagem CÂMERA BIOCAM CMOS SERIES 3.0® e software TSView 7.1.1.7® acoplados. A partir das imagens obtidas, foi realizada uma avaliação estereológica dos glomérulos renais, para identificar a densidade volumétrica ($Vv_{[glom]}$), densidade numérica ($Nv_{[glom]}$) e volume médio ($Vol_{[glom]}$).

Para determinar a tridimensão do rim utilizou-se o método estereológico Sistema-teste M_{42} (FIGURA 9). Esse foi superposto às imagens histológicas para a contagem de pontos e de intersecções-teste conforme descrito por Mandarin-de-Lacerda (2000).

FIGURA 9 – SISTEMA-TESTE M_{42} SUPERPOSTO À CÓRTEX RENAL. PODE-SE OBSERVAR QUE ALGUNS GLOMÉRULOS SÃO TOCADOS PELOS PONTOS-TESTE E ESTES ENTÃO SÃO INCLUÍDOS NA CONTAGEM DE GLOMÉRULOS.
DISTÂNCIA “d” = 100 MICRÔMETROS. AUMENTO DE 40X.



FONTE: O Autor (2015).

Para obtenção da densidade volumétrica dos glomérulos renais ($Vv_{[glom]}$):

$$Vv_{[glom]} = P_{[glom]} / PT \text{ (}\mu\text{m}^0\text{)}$$

onde:

$P_{[glom]}$ = números dos pontos que cruzam os glomérulos renais

PT = números de pontos-testes

Os valores da densidade volumétrica foram multiplicados por 100 para expressão dos resultados em percentagem.

Para obtenção da densidade numérica dos glomérulos renais ($Nv_{[glom]}$):

$$Vol[disector] = e \cdot At$$

$$Nv_{[glom]} = \Sigma Q^-_{A[glom]} / Vol[disector] \text{ (1/mm}^3\text{)}$$

onde:

e = espessura do micrômetro

At = área-teste do plano superior

$\Sigma Q^-_{A[glom]}$ = somatório do número de glomérulos renais

Para obtenção do volume médio dos glomérulos renais ($Vol_{[glom]}$):

$$Vol_{[glom]} = Vv_{[glom]} / Nv_{[glom]} \text{ (}\mu\text{m}^3\text{)}$$

Onde:

$Vv_{[glom]}$ = densidade volumétrica dos glomérulos renais

$Nv_{[glom]}$ = densidade numérica dos glomérulos renais

3.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO TECIDUAL

As amostras do rim esquerdo de cada animal foram descongeladas e os tecidos coletados foram homogeneizados com tampão fosfo-salino (PBS) gelado e centrifugados a 12.000x g durante 20 min a 4 °C.

O conteúdo que formou o sobrenadante nestas amostras foi transferido para tubos Eppendorf de 2 ml para as análises propostas a seguir, que foram realizadas, em parceria, pela equipe do Laboratório de Toxicologia Celular do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

Nas análises referentes ao estresse oxidativo foram consideradas:

3.4.1 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

Para esta avaliação foi utilizado o Método Fox (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991; JIANG; HUNT; WOLFF, 1992). O método consiste na rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} - laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a 570nm.

Nos tubos contendo 200µl de amostra foi adicionado 800µl de meio de reação [(laranja de xilenol a 100µM, H_2SO_4 a 25mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4mM, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sulfato ferroso amoniacal) a 250µM (acrescentados, na sequência descrita, em metanol PA)].

Após incubação durante 20 min a 30 °C, as amostras foram centrifugadas novamente a 9000x g durante 10 min. Em seguida, adicionou-se 200µl do sobrenadante a uma microplaca, procedendo-se a medida de absorbância a 570nm.

Sua unidade de medida é esboçada na forma de µmols de hidroperóxidos/mg de proteína.

3.4.2 AVALIAÇÃO DA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS (PCO)

Para esta análise foi utilizado o modelo previamente utilizado por Levine et al (1994) que se baseia na reação de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com proteínas carboniladas, formando um complexo que pode ser detectado na faixa de absorção da luz entre 358nm e 370nm.

Inicialmente todas as amostras foram normalizadas para 2mg.

Em cada tubo contendo 200µl das amostras já normalizadas, foi adicionado um volume de 500µl de DNPH [10mM de DNPH em 2M de Ácido Clorídrico (HCl)]. Para realizar o controle branco (que não absorve luz) a amostra foi adicionada a uma solução de HCl (2M, sem DNPH), sendo o conteúdo misturado em vortex e mantidas a 30°C por 1,5h.

A precipitação proteica foi induzida pela adição de 1ml de ácido tricloroacético a 28% e centrifugadas a 9000x g por 10 min. Os pellets de proteínas foram lavados duas vezes pela suspensão em etanol/etil acetado (1:1), misturados em vortex e centrifugados novamente. Então, para a remoção das substâncias insolúveis, a solubilização de proteínas foi induzida pela adição de 6 M de cloreto de guanidina e

centrifugação a 9000x g por 3min. Em seguida 200µl foram pipetados em microplaca e as carbonilas foram medidas espectrofotometricamente a 360nm. Uma curva com padrão de albumina de soro bovino (BSA) em diferentes concentrações na presença ou não de DNPH foi usada, para comparação das análises.

Sua unidade de medida é esboçada na forma de µmols de radicais carbonila/mg de proteína.

3.4.3 DOSAGEM DA GLUTATIONA E OUTROS TIÓIS

Um volume de 50µl de solução de ácido tricloroacético (50%) foi adicionado a 200µl do sobrenadante. Para o controle, utilizou-se 200µl de PBS.

Em seguida as amostras foram centrifugadas a 5000x g por 10 min a 4 °C. Em uma microplaca, 50µl da amostra foram pipetados em triplicata, sendo em seguida adicionado tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9 e uma solução de 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) na concentração final de 2,5mM. A placa foi mantida durante 5 minutos a 30 °C, e a absorbância foi medida a 415nm para o cálculo do conteúdo de GSH por comparação com uma curva-padrão (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Sua unidade de medida é esboçada na forma de µmols de Tióis não proteicos/mg de proteína.

3.4.4 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Para essa análise foi utilizado o método proposto por Crouch et al (1981). Esse método avalia a capacidade da Superóxido dismutase em inibir a redução do nitroazul de tetrazólio (NBT) para azul formazan pelo O_2^- gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo que a redução do NBT é medida espectrofotometricamente a 560nm.

Após determinação da concentração de proteínas, as amostras foram normalizadas para 2,0 mg.ml⁻¹. Em cada tubo contendo 200µl das amostras já normalizadas, foi adicionado 50 µl de etanol. O conteúdo foi imediatamente centrifugado a 12 000x g (4 °C) durante 20 min. Em seguida, foram pipetados 10 µl do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços. Como controle branco foram pipetados 10µl de etanol a 25% em PBS. Em seguida adicionou-se em cada poço 20µl de água deionizada. Após, foram adicionados 70µl da amostra de solução de NBT 100µM com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,05mM, e

100µl de solução de hidroxilamina (36,85mM) para iniciar a reação. A absorbância foi medida em 560nm em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.

Sua unidade de medida é esboçada na forma de Unidades de atividade/mg de proteína. Sendo que a Unidade de atividade é definida como a capacidade enzimática de inibir a redução do NBT em 50% em relação a curva de referência e é obtida pelo seguinte calculo: $(|Absorbância\ final\ da\ curva\ de\ referência - Absorbância\ Inicial\ da\ curva\ referência|) / 2. (|Absorbância\ final\ da\ curva\ da\ amostra - Absorbância\ Inicial\ da\ curva\ da\ amostra|)$.

3.4.5 ATIVIDADE DA CATALASE

Para essa análise foi utilizado o método proposto por Aebi (1984). Esse método é baseado no decréscimo de absorbância a 240nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

Após determinação da concentração de proteínas, as amostras foram normalizadas para 1,0mg.ml⁻¹. Em uma cubeta de quartzo, foram adicionados 990µl do meio de reação constituído por 2,5ml de Tampão Tris – HCl 1,0 M, EDTA 5,0mM, pH 8,0, 47,32 ml de água deionizada, e 180µl de H₂O₂ (30%, d=1,1 g.ml⁻¹, 1,0 MM = 34 g.mol⁻¹; concentração final 30mM). Em seguida 10µl da amostra foram adicionados a cubeta, e misturados por inversão, sendo imediatamente mensurada a absorbância a 240nm (tempo total = 60s, intervalos = 1s) em espectrofotômetro de cubeta. Como branco foi utilizado somente o meio de reação.

Sua unidade de medida é esboçada na forma de µmols de H₂O₂ degradado/mg de proteína.

3.5 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

O conjunto de dados encontrados foi analisado a partir da determinação de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões.

Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas que atenderam a condição de normalidade foi considerado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator. O teste LSD (*least significant difference*) foi usado para as comparações dos grupos dois a dois.

Para o volume médio glomerular a comparação dos grupos foi feita usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

Para cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais em todos os grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem média diferente dos demais. No caso de rejeição da hipótese nula, os grupos foram comparados dois a dois.

Com relação aos dados relacionados ao estresse oxidativo foi utilizado como variável independente o tempo de vida do animal, e então os valores absolutos obtidos pela dosagem de Carbonilação proteica, peroxidação lipídica, tióis não proteicos e atividade de catalase e superóxido dismutase, utilizados como uma variável dependente.

Todos os valores obtidos foram plotados em planilha no programa Microsoft Excel 365 Home Edition, então submetidos a análise estatística por meio do programa SAS JMP Statistical Discover 10.0. Para a criação do gráfico dos pesos e altura dos animais foi utilizado o programa Graphpad Prism 5.03.

Inicialmente as variáveis dependentes foram submetidas a uma análise de padrão de normalidade, utilizando o teste estatístico de Shapiro-Wilks. As dosagens que não obtiveram um padrão de normalidade tiveram seus valores logaritmizados e submetidos novamente ao teste, uma vez que algumas amostras podem obter normalidade apenas quando expressas na forma de logaritmo (LIMPET; STAHEL, 2011).

Para os valores que obtiveram um padrão de normalidade foi utilizado uma análise estatística utilizando o teste de Tukey-Kramer, para a comparação pareada entre os diferentes grupos de tempo.

Para os valores que não obtiveram um padrão de normalidade, foi realizado uma análise utilizando o teste pareado de Wilcoxon.

Para os valores de p obtidos foram considerados estatisticamente significantes os valores menores que 0,05.

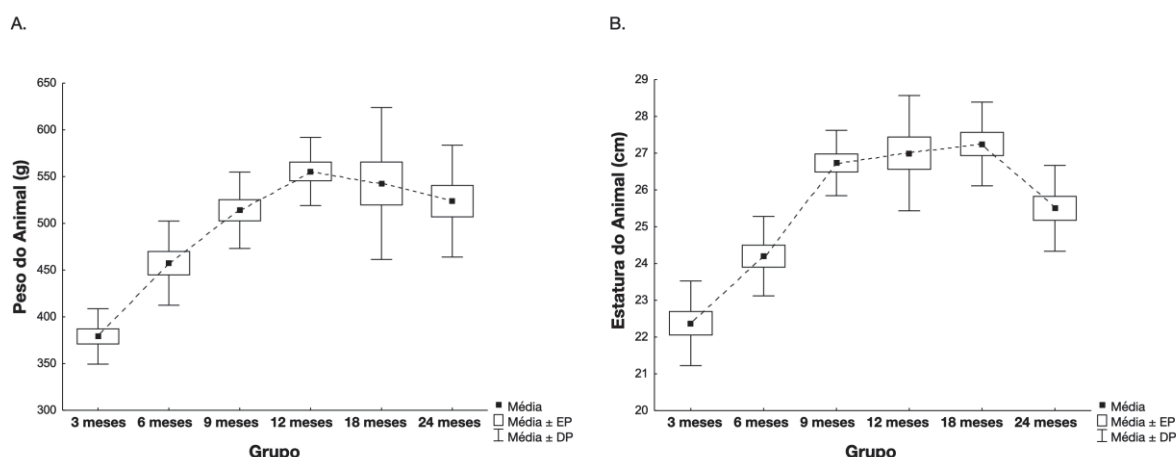
Por último, foi realizado uma avaliação de correlação por meio do teste de correlação multivariável, sendo considerado significativa quando apresentou um resultado com valor $p < 0,05$ e um coeficiente de correlação (r) $> 0,5$.

4 RESULTADOS

4.1 ANIMAIS

Conforme maior longevidade, os animais passaram a apresentar mudanças compatíveis com o processo de envelhecimento, incluindo uma redução na atividade geral e aumento da rarefação de pelos. Com relação ao peso e comprimento, um aumento progressivo foi identificado entre os grupos, padrão que foi interrompido de acordo com a análise dos animais sacrificados aos 12 meses e que apresentou leve declínio nos grupos subsequentes (FIGURA 10). Não houve perdas inesperadas durante o estudo, sendo que no último grupo todos os 12 animais com 24 meses estavam vivos.

FIGURA 10 - A) GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DO PESO (EM GRAMAS) DOS ANIMAIS NOS GRUPOS (MÉDIA, ERRO PADRÃO E DESVIO PADRÃO). B) EVOLUÇÃO DO COMPRIMENTO DOS ANIMAIS (EM CENTÍMETROS) NOS DIFERENTES GRUPOS (MÉDIA, ERRO PADRÃO E DESVIO PADRÃO).



FONTE: o autor (2020).

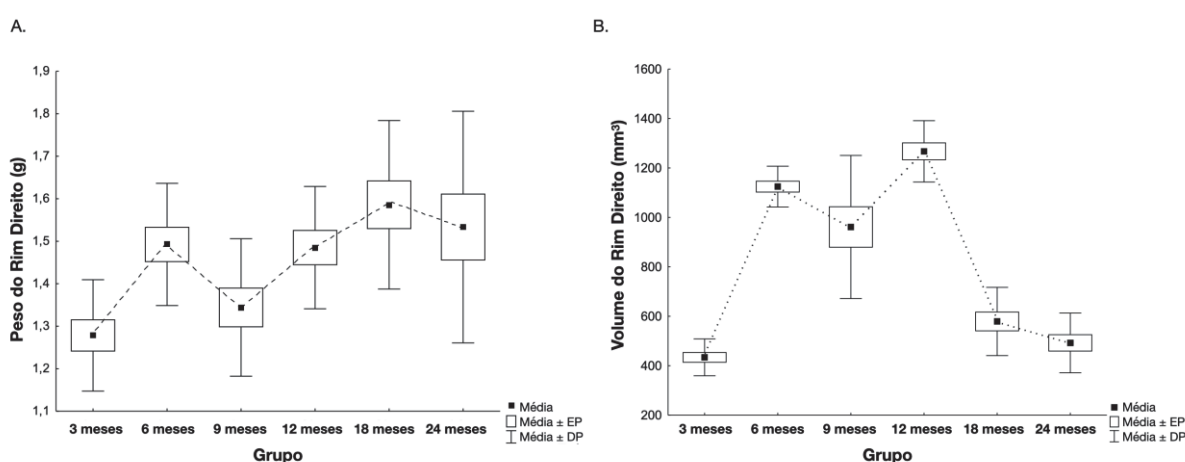
4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA RENAL

A aferição do peso renal revelou valores estatisticamente menores no grupo de animais com 3 meses de idade (média de $1,28 \pm 0,13g$) em comparação com os demais grupos (exceto grupo de 9 meses) (Figura 11A).

O volume renal aferido apresentou aumento estatisticamente significativo entre os grupos de 3 meses de idade (média de $433,8 \pm 74,58mm^3$) e o grupo de 6 meses (média de $1124,6 \pm 82,5mm^3$) ($p < 0,001$). Também foi evidenciado aumento significativo do volume renal entre os animais do grupo de 6 meses em comparação

com o grupo de animais com 12 meses de idade (média de $1267,2 \pm 124,0 \text{ mm}^3$) ($p=0,028$). Após um pico com o grupo de 12 meses, ocorreu diminuição progressiva do volume renal, sendo que a comparação entre os grupos de 12 e 18 meses (média de $579,1 \pm 137,9 \text{ mm}^3$) foi também estatisticamente significativa ($p<0,001$) (Figura 11B).

FIGURA 11 – A) GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DO PESO DO RIM DIREITO (EM GRAMAS) NOS DIFERENTES GRUPOS (MÉDIA, ERRO PADRÃO E DESVIO PADRÃO). B) GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DO VOLUME DO RIM DIREITO (EM mm^3) NOS DIFERENTES GRUPOS (MÉDIA, ERRO PADRÃO E DESVIO PADRÃO).



FONTE: o autor (2020).

4.3 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

Com relação à densidade volumétrica dos glomérulos renais ($V_{v[\text{glom}]}$), houve diminuição progressiva entre os grupos, que pode ser considerada estatisticamente relevante conforme análise da aferição quantitativa dos dados (TABELA 3 e FIGURA 12).

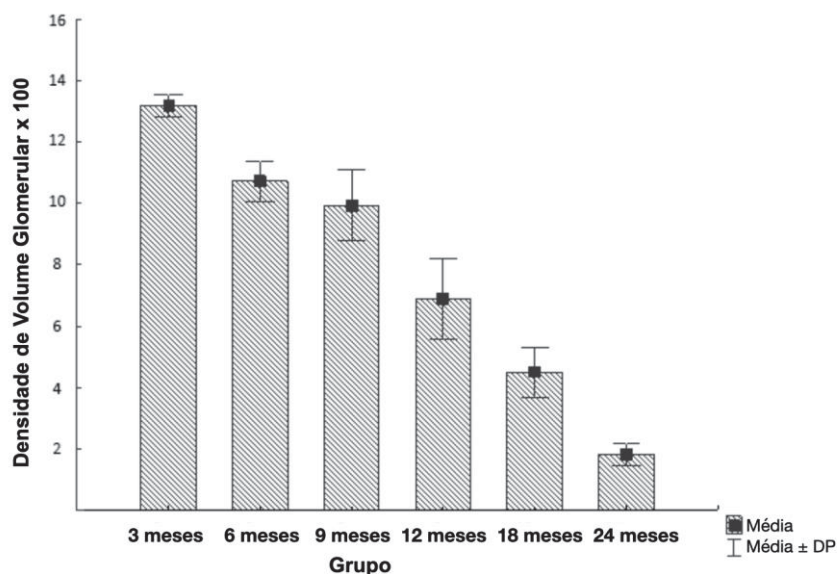
TABELA 3 - RESULTADO DOS VALORES DA DENSIDADE DE VOLUME DOS GLOMÉRULOS RENAIIS ($Vv_{[glom]}$) NOS GRUPOS (EM $\mu m^3 \times 100$ - OS VALORES OBTIDOS FORAM EXPRESSOS EM PORCENTAGENS)

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|---------------------------------|----------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| $Vv_{[glom]}$ | 3 meses | 12 | 13.18 | 13.26 | 12.62 | 13.71 | 0.37 | <0.001 |
| | 6 meses | 12 | 10.72 | 10.81 | 9.38 | 11.81 | 0.66 | |
| | 9 meses | 12 | 9.94 | 10.24 | 7.81 | 11.91 | 1.15 | |
| | 12 meses | 12 | 6.90 | 6.41 | 5.24 | 9.38 | 1.32 | |
| | 18 meses | 12 | 4.50 | 4.36 | 3.10 | 5.62 | 0.83 | |
| | 24 meses | 12 | 1.82 | 1.67 | 1.43 | 2.43 | 0.35 | |

*ANOVA com um fator, $p < 0.05$

FONTE: o autor (2020).

FIGURA 12 - GRÁFICO COM OS VALORES DA DENSIDADE DE VOLUME DOS GLOMÉRULOS RENAIIS ($Vv_{[glom]}$) NOS GRUPOS (EM $\mu m^3 \times 100$ - OS VALORES OBTIDOS FORAM EXPRESSOS EM PORCENTAGENS)



FONTE: o autor (2020).

A aferição da densidade, em termos de concentração glomerular quantitativa ($Nv_{[glom]}$), demonstrou diminuição estatisticamente significativa entre os grupos de ratos com 3 meses de idade (média de $1657,7 \pm 31,3$ glomérulos por mm^3) e 6 meses de idade (média de $1353,2 \pm 128,9$ glomérulos por mm^3) ($p < 0,001$). Foi evidenciado aumento na densidade numérica nos ratos com 9 meses de idade (média de $1487,1 \pm 157,8$ glomérulos por mm^3) em relação ao grupo de 6 meses ($p = 0,007$). A densidade numérica dos glomérulos renais nos grupos após os 9 meses de idade voltou a

apresentar diminuição progressiva até atingir uma média de $264,2 \pm 50,7$ glomérulos por mm^3 no grupo de ratos com 24 meses. Esta diminuição progressiva apresentou forte relevância estatística ($p < 0,001$) (TABELA 4, FIGURA 13 e FIGURA 14).

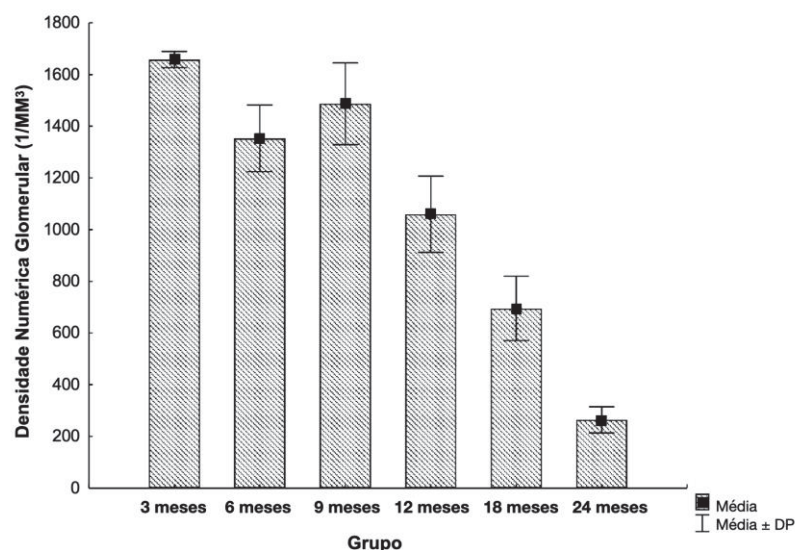
TABELA 4 - RESULTADO DOS VALORES DA DENSIDADE NUMÉRICA DOS GLOMÉRULOS RENAIIS ($N_{V[\text{GLOM}]}$) NOS GRUPOS (VALORES EM $1/\text{mm}^3$)

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|--|----------|----|--------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| $N_{V[\text{glom}]}$ | 3 meses | 12 | 1657.7 | 1662.1 | 1604.4 | 1717.9 | 31.3 | <0.001 |
| | 6 meses | 12 | 1353.2 | 1351.0 | 1138.5 | 1608.9 | 128.9 | |
| | 9 meses | 12 | 1487.1 | 1508.2 | 1250.0 | 1771.9 | 157.8 | |
| | 12 meses | 12 | 1059.5 | 1063.1 | 799.1 | 1283.2 | 147.5 | |
| | 18 meses | 12 | 694.9 | 655.5 | 461.0 | 927.5 | 124.4 | |
| | 24 meses | 12 | 264.2 | 242.3 | 207.6 | 353.0 | 50.7 | |

*ANOVA com um fator, $p < 0.05$

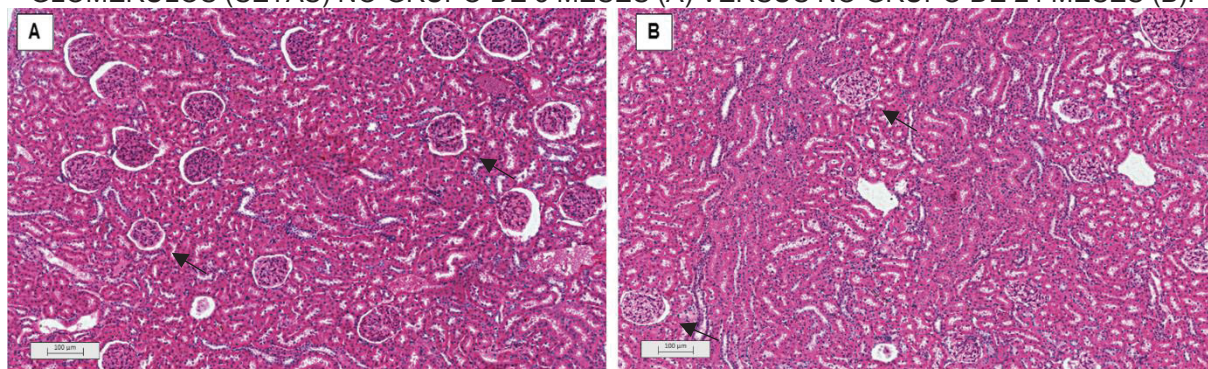
FONTE: o autor (2020).

FIGURA 13 - GRÁFICO COM OS VALORES DA DENSIDADE NUMÉRICA DOS GLOMÉRULOS RENAIIS ($N_{V[\text{GLOM}]}$) NOS GRUPOS (VALORES EM $1/\text{mm}^3$)



FONTE: o autor (2020).

FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIA DO CÓRTEX RENAL USANDO HEMATOXILINA-EOSINA. AMPLIAÇÃO: 40x. DIFERENÇA ACENTUADA ENTRE O NÚMERO DE IDENTIFICADOS GLOMÉRULOS (SETAS) NO GRUPO DE 3 MESES (A) VERSUS NO GRUPO DE 24 MESES (B).



FONTE: o autor (2015).

O volume médio dos glomérulos renais ($Vol_{[GLOM]}$) não apresentou diferença estatística entre os grupos de ratos com 3 e 6 meses de idade ($p=0,792$). Entre os grupos de animais com 6 meses e os restantes com ratos de idade mais avançada, ocorreu diminuição estatisticamente significativa ($p<0,001$) do volume médio dos glomérulos. Entre os animais com idade maior que 9 meses, o volume médio glomerular não apresentou alterações significativas (TABELA 5 e FIGURA 15).

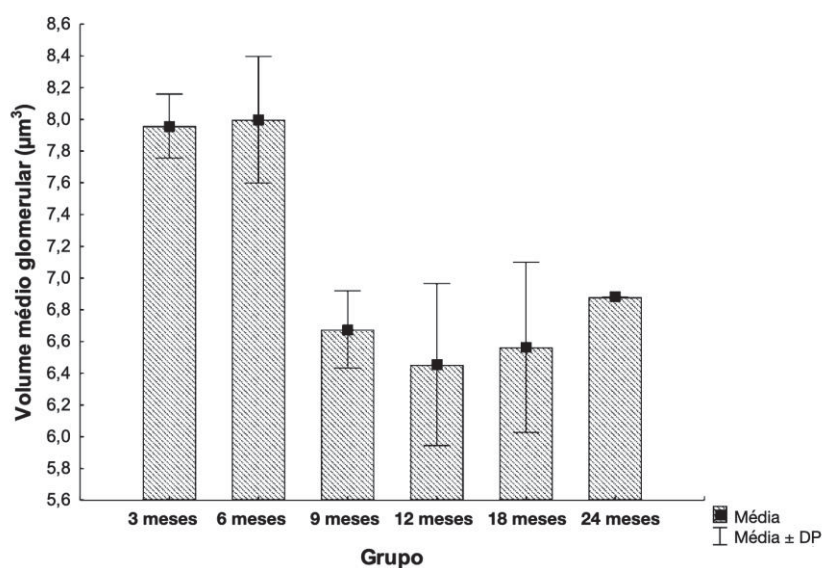
TABELA 5 - RESULTADO DOS VALORES DO VOLUME MÉDIO DOS GLOMÉRULOS RENAI (Vol_[GLOM]) NOS GRUPOS (VALORES EM μm^3)

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|------------------|----------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| Vol[glom] | 3 meses | 12 | 7.96 | 7.99 | 7.67 | 8.26 | 0.20 | <0.001 |
| | 6 meses | 12 | 8.00 | 8.03 | 7.19 | 8.58 | 0.40 | |
| | 9 meses | 12 | 6.68 | 6.73 | 6.22 | 7.08 | 0.24 | |
| | 12 meses | 12 | 6.45 | 6.48 | 5.83 | 7.37 | 0.51 | |
| | 18 meses | 12 | 6.56 | 6.66 | 5.37 | 7.26 | 0.54 | |
| | 24 meses | 12 | 6.88 | 6.88 | 6.88 | 6.88 | 0.001 | |

*ANOVA com um fator, $p < 0.05$

FONTE: o autor (2020).

FIGURA 15 - GRÁFICO COM OS VALORES DO VOLUME MÉDIO DOS GLOMÉRULOS RENAIIS ($Vol_{[GLOM]}$) NOS GRUPOS (VALORES μM^3)



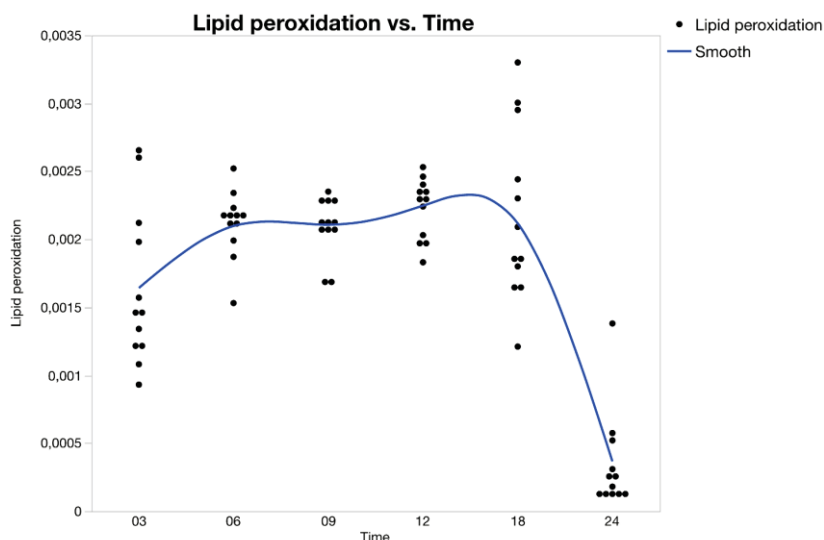
FONTE: o autor (2020).

4.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO TECIDUAL

4.4.1 MARCADORES DE DANO OXIDATIVO

A análise dos resultados para peroxidação lipídica utilizando o teste pareado de Wilcoxon demonstrou que ocorreu redução significativa ($p < 0,05$) nos animais do grupo de 24 meses de vida em comparação com os demais grupos. O tecido renal dos ratos dos demais grupos apresentaram valores semelhantes dessa variável (FIGURA 16).

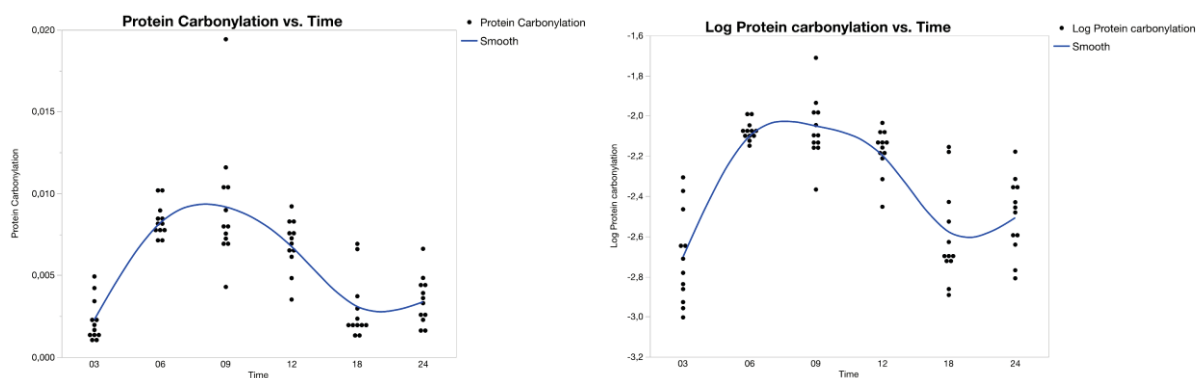
FIGURA 16 - GRÁFICO COM VALORES DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NOS GRUPOS.
UNIDADE DE MEDIDA: MMOLS DE HIDROPEROXIDOS.MG PROT⁻¹



FONTE: o autor (2020).

As concentrações de carbonilas proteicas foi analisada através do teste de Tukey-Kramer e não apresentaram variação uniforme e significativamente crescente entre os grupos analisados, porém houve maior concentração, com significância estatística ($p < 0,05$), no tecido renal dos animais com 6, 9 e 12 meses de idade em comparação com os ratos dos demais grupos (FIGURA 17).

FIGURA 17 - GRÁFICO COM VALORES DA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS GRUPOS.
UNIDADE DE MEDIDA: MMOLS DE RADICAIS CARBONILA.MG PROT⁻¹

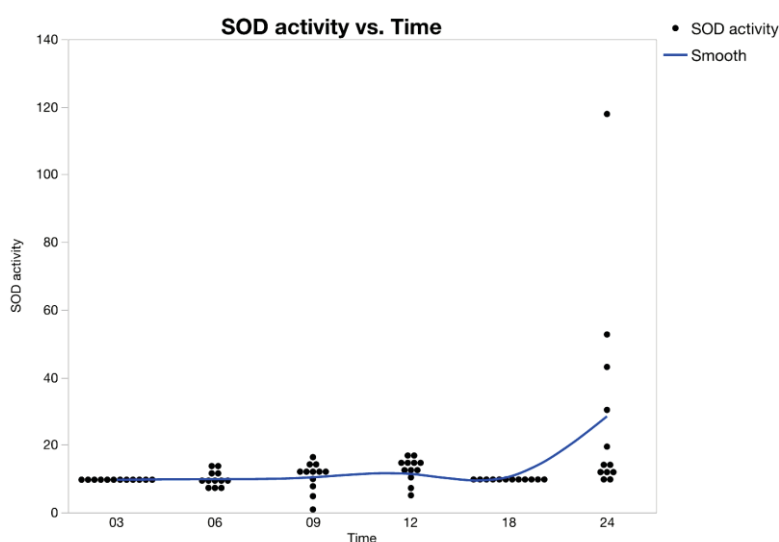


FONTE: o autor (2020).

4.4.2 FATORES ANTI-OXIDANTES

A análise da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) utilizando o teste pareado de Wilcoxon demonstrou maiores valores, com significância estatística ($p < 0,05$), no tecido renal dos animais mais idosos (24 meses de vida) em comparação com o evidenciado nos animais de todos os grupos mais jovens (FIGURA 18).

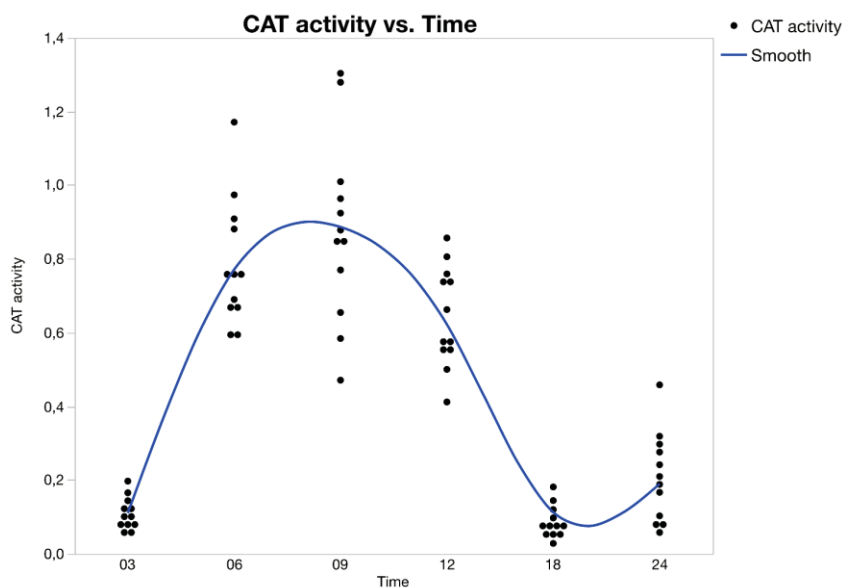
FIGURA 18 - GRÁFICO COM VALORES DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NOS GRUPOS. UNIDADE DE MEDIDA: (UNIDADES DE ATIVIDADE.MG PROT⁻¹)



FONTE: o autor (2020).

A atividade da enzima catalase (CAT), analisada através do teste de Tukey-Kramer, não apresentou variação uniforme e significativamente crescente entre os grupos analisados. Houve semelhante atividade enzimática entre os animais dos grupos de 3, 18 e 24 meses e também ocorreu semelhante comportamento da atividade da enzima catalase entre os grupos de 6, 9 e 12 meses. Comparando com os ratos de tempo de vida intermediário (6 a 12 meses de vida), os animais mais velhos (18 e 24 meses de vida) demonstraram redução considerável na atividade enzimática da catalase ($p < 0,05$) (FIGURA 19).

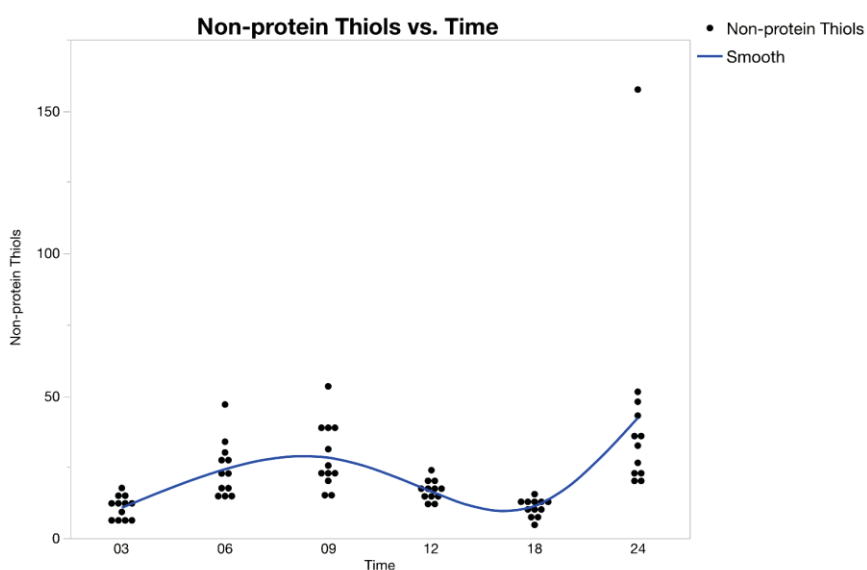
FIGURA 19 - GRÁFICO COM VALORES DA ATIVIDADE DA CATALASE NOS GRUPOS
UNIDADE DE MEDIDA: MMOLS DE H_2O_2 DEGRADADO.MG PROT⁻¹



FONTE: o autor (2020).

As dosagens bioquímicas de tióis não proteicos, analisadas através do teste de Tukey-Kramer, não apresentaram variação uniforme e significativamente crescente entre os grupos analisados, porém houve maior concentração, com significância estatística ($p=0,0002$), quando comparado isoladamente as dosagens nos grupos de animais com 24 meses de vida e os animais com 3 meses (FIGURA 20).

FIGURA 20 - GRÁFICO COM CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS NOS GRUPOS
UNIDADE DE MEDIDA: (MMOL TIÓIS NÃO PROTEICOS.MG PROT⁻¹)



FONTE: o autor (2020).

5 DISCUSSÃO

A utilização de modelos animais em estudos experimentais vem sendo amplamente difundido desde o início do século passado, e mesmo com sua redução nas últimas duas décadas devido a preocupações éticas, estima-se que ainda sejam usados cerca de 12 milhões de animais por ano em pesquisas nos Estados Unidos (VAN ZUTPHEN, 2002).

Em pesquisas sobre envelhecimento e longevidade esse modelo torna-se fundamental, pois possibilita acompanhar todo o ciclo de vida em um menor período de tempo e controlar a exposição ambiental durante toda a vida do animal. Trata-se de um modelo importante, visto que, desde as últimas décadas do século XX, o interesse da comunidade científica pelos estudos relacionados ao envelhecimento tem crescido significativamente (PAPALÉO NETTO, 2011).

Durante este experimento, os ratos no último grupo foram considerados idosos, com base em seu ciclo de vida, que se encerrou aos 24 meses (QUINN, 2005). E, com base nas curvas-padrão propostas em outros estudos, a evolução do peso foi considerada apropriada (COSSIO-BOLAÑOS et al., 2013).

Várias são as alterações histopatológicas associadas ao processo de envelhecimento renal, tais como: atrofia do órgão, diminuição do número de células epiteliais dos túbulos contorcidos, diminuição do número e redução volumétrica dos néfrons, alterações arteriais e aumento do número de células do interstício renal e fibrose intersticial (NUSSENZVEIG, 2000; TAUCHI; TSUBOI; OKUTIMI, 1971). Neste estudo, a determinação das repercussões renais associadas ao envelhecimento foi baseada na morfometria e estereologia (BERTRAM, 1995).

Com relação ao comportamento do peso renal dos ratos durante o envelhecimento, Takeda (1992), Alabarse e colaboradores (2011) encontraram dados semelhantes aos do presente estudo e que reforçam a ausência de variações significativas do peso renal durante o processo de envelhecimento. Porém, no estudo de Alabarse, o peso dos rins apresentou média levemente superior ao do nosso estudo.

A análise do volume renal dos animais, apresentou aumento gradual, com pico aos 12 meses, seguido de diminuição progressiva, o que demonstra o processo de atrofia do órgão em animais mais velhos (OWEN; HEYWOOD, 1986; MELCHIORETTO, 2016).

A análise estereológica sugere, com forte significância estatística, a diminuição progressiva nas densidades volumétrica e numérica dos glomérulos presentes no tecido renal de ratos sucessivamente mais velhos, demonstrando as mudanças resultantes do processo de envelhecimento renal. Já no início do século XX (1926), Arataki publicou estudo com achados semelhantes, porém com metodologia mais simples e sem uso da estereologia.

Ao longo dos estágios de vida sucessivos dos animais estudados, foi evidenciada variação no volume médio glomerular, apresentando uma curva de variação compatível com o que foi encontrado em estudos conduzidos em humanos (GOYAL, 1982; SILVA, 2005). No presente trabalho, foi identificado uma diminuição do volume médio glomerular nos animais a partir do grupo de 9 meses que não se refletiu com o achado de Cortes e colaboradores (1992). Pelo contrário, no estudo em questão, a média de volume glomerular apresentou aumento progressivo em Fischer rats, conforme o seu envelhecimento. Naquele cenário, a diminuição do número de glomérulos com função preservada resultou, possivelmente, num processo de hipertrofia compensatória como resposta por parte dos glomérulos restantes em ratos senis (CORTES et al., 1992).

No presente estudo, foi avaliado o dano oxidativo através da identificação da peroxidação lipídica e da carbonilação proteica no tecido renal dos animais de diferentes tempos de vida.

Na análise da peroxidação lipídica não foi possível encontrar um padrão claro de evolução. Quando realizamos uma análise mais simples e comparamos apenas o grupo mais jovem com o grupo mais velho, encontramos uma redução significativa desse marcador no grupo mais velho, com significância estatística. Em discordância aos dados do presente estudo, Arivazhagan e colaboradores em 2000, evidenciaram um aumento significativo da peroxidação lipídica em ratos senis, mais condizente com o esperado durante o envelhecimento e também semelhante ao encontrado por Uzun e colaboradores (2013).

Quando analisamos as curvas de carbonilação proteica, encontramos uma redução significativa nos grupos mais velhos quando comparados aos animais com 6 a 12 meses de vida, muito semelhante ao evidenciado no trabalho de Alabarse e colaboradores (2011). Esse fenômeno pode estar relacionado ao menor consumo tecidual de oxigênio em idosos por uma redução da quantidade total de proteínas que ocorre no tecido durante o envelhecimento, onde glomérulos são progressivamente

substituídos por tecido fibroso (MANDARIM-DE-LACERDA, 2000). Resultados semelhantes aos encontrados aqui para o tecido renal foram vistos anteriormente em outros órgãos de ratos machos ao longo dos estágios monitorados. Por exemplo, os níveis de carbonila pulmonar foram maiores aos 6 meses de idade do que aos três e 12 meses de idade (HACKENHAAR et al., 2009); os níveis de carbonila no cérebro eram mais altos aos 6 meses do que aos três e 12 meses e a atividade da SOD no cérebro diminuiu de três para 6 meses de idade (EHRENBRINK et al., 2006). Como mencionado previamente, as diferenças encontradas entre os órgãos estão relacionadas a um cenário multifatorial que envolve as especificidades inerentes à respectiva fisiologia e impacto nos comportamentos oxidativos (EHRENBRINK et al., 2006). No entanto, mesmo com diferentes padrões de oxidação ao longo da atividade funcional, o envelhecimento impõe uma influência global sobre o corpo. Ao longo do tempo, haverá processos oxidativos similares, mesmo entre diferentes órgãos.

A análise de atividade da Superóxido Dismutase, da Catalase e dos níveis de Tióis não-proteicos, demonstrou que os três principais fatores antioxidantes não apresentaram um padrão linear crescente durante a vida do animal.

Os grupos dos Tióis são agentes redutores que podem ser utilizados como uma via alternativa de avaliação das repercussões oxidativas. Níveis menores de Tióis são indicativos de um aumento no estresse oxidativo (SOSZYŃSKI E BARTOSZ, 1997).

O presente estudo identificou que o grupo de animais com 24 meses, quando comparados ao grupo de 3 meses, apresentou atividade aumentada de superóxido dismutase e níveis mais elevados de Tióis não-proteicos. Estes achados corroboram com o fato de ter ocorrido uma maior atividade antioxidante nos animais mais idosos e poderia explicar a não identificação de um dano oxidativo mais impactante.

Ao contrário do ocorrido nos animais de nosso trabalho, Uzun e colaboradores (2013) identificaram uma diminuição significativa na atividade da superóxido dismutase do tecido renal de ratos com 24 meses de idade em comparação com ratos de apenas 6 meses de vida. Outros estudos não encontraram diferença significativa na atividade da superóxido dismutase no tecido renal durante o processo de envelhecimento (GÜNDÜZ et al., 2004; ALABARSE et al., 2011).

Também em contrapartida do identificado em nosso estudo, Aydın e colaboradores (2012) evidenciaram uma diminuição significativa da concentração de Tióis não-proteicos no grupo de animais mais velhos. Outros estudos não encontraram

diferenças relevantes na concentração de Tióis não-proteicos em animais com diferentes tempos de vida (EPPLER e DAWSON, 2001; UZUN et al., 2013).

Com relação a atividade da enzima catalase no tecido renal dos animais, a análise demonstrou que houve semelhante atividade enzimática entre os animais com idades intermediárias (6 a 12 meses de vida) e diminuição significativa na atividade da catalase nos animais idosos (com 18 e 24 meses de vida). Esta queda na atividade da CAT durante o processo de envelhecimento é condizente com dados de outros estudos, como por exemplo, Gündüz e colaboradores (2004), que investigou o papel do exercício físico na redução das repercussões do estresse oxidativo em ratos Wistar. No estudo em questão, foi observado que o grupo sem intervenção apresentou uma redução de 45% na atividade da Catalase no tecido renal de animais com 24 meses, em comparação com animais com 9 meses.

Apesar da análise de correlação não mostrar a existência de uma relação linear entre os fatores antioxidantes, podemos inferir que ocorreu uma elevação dos Tióis não-proteicos e aumento da atividade da superóxido dismutase para compensar a queda da atividade da catalase; essa ideia é corroborada quando vemos que mesmo com a redução da principal via antioxidante (catalase) não ocorreu aumento dos marcadores de dano oxidativo (peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas) no grupo mais velho, inclusive com uma redução destes.

Como já é mostrado na literatura, o impacto do envelhecimento sobre as enzimas antioxidantes ainda aponta para achados controversos (DOĞRU-ABBASOĞLU et al. 1997; DE e DARAD 1991; GOMI e MATSUO 1998; JUNG e HENKE 1996). Além disso, com o tempo, a performance destas enzimas geralmente passa por modificações variadas de acordo com os diferentes tecidos (SOHAL et al. 1990).

Não há estudo prévio sobre o rim com foco na análise estereológica do tecido renal, estresse oxidativo e envelhecimento associados. Os resultados atuais esclarecem muitas alterações no estresse oxidativo sofrido pelo tecido renal durante o envelhecimento nos ratos, entretanto ainda há muito a ser estudado.

6 CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que:

1. De acordo com o envelhecimento cronológico, a análise morfométrica e estereológica evidenciou significativa atrofia renal, associada a redução progressiva da densidade de volume e densidade numérica dos glomérulos renais. Neste contexto, não foi encontrada hipertrofia glomerular compensatória nos ratos senis.
2. Ocorreu uma redução na peroxidação lipídica do tecido renal do grupo mais idoso. Também houve redução nos níveis de carbonilação proteica decorrente do envelhecimento.
3. Houve redução na atividade da enzima Catalase em relação aos grupos jovens com um discreto aumento nos níveis de Tióis não-proteicos e da atividade da Superóxido Dismutase nos grupos mais velhos.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D.S.P.; SENA, K.C.M.D. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 749-756, 2008. doi:10.1590/s1415-52732008000600013.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984. doi:10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
- AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Effects of chronic high fat diets on renal function and cortical structure in rats. **Exp Toxicol Pathol**, v. 55, n. 2-3, p. 187-195, jan. 2003. doi:10.1078/0940-2993-00313.
- ALABARSE, P.V. *et al.* Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. **Exp Gerontol**, v. 46, n. 10, p. 773-780, out. 2011. doi:10.1016/j.exger.2011.05.006.
- ARATAKI, M. On the postnatal growth of the kidney, with special reference to the number and size of the glomeruli (albino rat). **Am J Anat**, v. 36, n. 3, p. 399-436, jan. 1926. doi:1002/aja.1000360302.
- ARIVAZHAGAN, P.; THILAKAVATHY, T.; PANNEERSELVAM, C. Antioxidant lipoate and tissue antioxidants in aged rats. **J Nutr Biochem**, v. 11, n. 3, p. 122-127, mar. 2000. doi:10.1016/s0955-2863(99)00079-0.
- AYDIN S. *et al.* Comparison of oxidative stress biomarkers in renal tissues of d-galactose induced, naturally aged and young rats. **Biogerontology**, v. 13, n. 3, p. 251-260, dez. 2011. doi:10.1007/s10522-011-9370-3.
- BARBER, A.A.; BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. **Adv Gerontol Res**, v. 2, p. 355-403, 1967. PMID:5339163.
- BARBOSA, K.B.F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010. doi:10.1590/s1415-52732010000400013.
- BERTRAM, J.F. Analyzing Renal Glomeruli with the New Stereology. **Int Rev Cytol**, p. 111-172, 1995. doi:1016/s0074-7696(08)62497-3.
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guide to the care and use of experimental animals**. Ottawa, v. 1, 2nd edition, 1993. Disponível em: <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2020.
- CASSOTTI, G. Effects of season on kidney morphology in house sparrows. **J Exp Biol**, v. 204, n.6, p. 1201-1206, 2001. PMID:11222135.

CATTA-PRETA, M. *et al.* Adult cardiorenal benefits from postnatal fish oil supplement in rat offspring of low-protein pregnancies. **Life Sci**, v. 80, n. 3, p. 219-229, dez. 2006. doi:10.1016/j.lfs.2006.09.004.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, jul. 1979. doi:10.1152/physrev.1979.59.3.527.

CHEVALIER, R.L.; FORBES, M.S. Generation and evolution of atubular glomeruli in the progression of renal disorders. **J Am Soc Nephrol**. v. 19, n. 2, p. 197-206, jan. 2008. doi:10.1681/asn.2007080862.

CIBULSKYTE, D. *et al.* Renal effects of long-term ciclosporin A treatment in a large animal model. **Nephron Exp Nephrol**, v. 105, n. 4, p. 91-97, jan. 2007. Erratum in: **Nephron Exp Nephrol**, v. 108, n. 4, p. e79, 2008. doi:10.1159/000099003.

CORTES, P. *et al.* Age-Related Changes in Glomerular Volume and Hydroxyproline Content in Rat and Human. **J Am Soc Nephrol**, v. 2, n. 12, p. 1716-1725, jun. 1992. PMID:1498277.

COSSIO-BOLAÑOS, M. *et al.* [Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats]. **Nutr Hosp**, v. 28, n. 6, p. 2151-6, v. 28, n. 6, p. 2151-6, nov-dez. 2013. PMID:24506395.

CROUCH, R.K. *et al.* The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235-241, mar. 1981. doi:10.2337/diab.30.3.235.

CUI, H.; KONG, Y.; ZHANG, H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. **J Signal Transduct**, v. 2012, p. 1-13, 2012. doi:10.1155/2012/646354.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 2, p. 389-406, abr. 2006. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x.

DAVIDOVIC M. *et al.* Old age as a privilege of the “selfish ones”. **Aging Dis**, v. 1, n. 2, p. 139-146, out. 2010. PMID: 22396861.

DE, A.K.; DARAD, R. Age-associated changes in antioxidants and antioxidative enzymes in rats. **Mech Ageing Dev**, v. 59, n. 1-2, p. 123-128, jun. 1991. doi:10.1016/0047-6374(91)90078-e.

DENIC, A.; GLASSOCK, R.J.; RULE, A.D. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 23, n. 1, p.19-28, jan. 2016. doi:10.1053/j.ackd.2015.08.004.

DENIC, A. *et al.* The Substantial Loss of Nephrons in Healthy Human Kidneys with Aging. **J Am Soc Nephrol**, v. 28, n. 1, p. 313-320, jul. 2016. doi:10.1681/asn.2016020154.

DICKINSON, H. *et al.* Maternal dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters renal gene expression in the fetal spiny mouse. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 1, p. R453-R461, jan. 2007. doi:10.1152/ajpregu.00481.2006.

DOĞRU-ABBASOĞLU, S. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in livers and brains of aged rats. **Mech Ageing Dev**, v. 98, n. 2, p. 177-180, out. 1997. doi:10.1016/s0047-6374(97)00082-1.

DRAGAN, V.P. *et al.* Comparison of the effects of tamoxifen and toremifene on liver and kidney tumor promotion in female rats. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 11, p. 2733-2741, nov. 1995. doi:10.1093/carcin/16.11.2733.

EHRENBRINK, G. *et al.* Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. **Exp Gerontol**, v. 41, n. 4, p. 368-371, abr. 2006. doi:10.1016/j.exger.2006.02.007.

EIKELENBOOM, P. *et al.* Neuroinflammation in plaque and vascular beta-amyloid disorders: clinical and therapeutic implications. **Neurodegener Dis**, v. 5, n. 3-4, p. 190-193, Mar. 2008. doi:10.1159/000113699.

EPPLER, B.; DAWSON, R. JR. Dietary taurine manipulations in aged male Fischer 344 rat tissue: taurine concentration, taurine biosynthesis, and oxidative markers. **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 1, p. 29-39, jul. 2001. doi:10.1016/s0006-2952(01)00647-5.

GARINIS, G.A. *et al.* DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 11, p. 1241-1247, nov. 2008. doi:10.1038/ncb1108-1241.

GLASSOCK, R.; DENIC, A.; RULE, A.D. When kidneys get old: an essay on nephro-geriatrics. **J Bras Nefrol**, v. 39, n. 1, p. 59-64, mar. 2017. doi:10.5935/0101-2800.20170010.

GOMI, F.; MATSUO, M. Effects of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 53, n. 3, p. B161-167, mai.1998. doi:10.1093/gerona/53a.3.b161.

GOYAL, V.K. Changes with age in the human kidney. **Exp Gerontol**, v. 17, n. 5, p. 321-331, jan. 1982. doi:10.1016/0531-5565(82)90032-8>.

GUNDERSEN, H.J.G.; JENSEN, E.B. Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. **J Microsc**, v. 138, n. 2, p. 127-142, mai. 1985. doi:10.1111/j.1365-2818.1985.tb02607.x.

GÜNDÜZ F. *et al.* The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. **Physiol Res**, v. 53, n. 2, p. 171-176, 2004. PMID:15046553.

HACKENHAAR, F.S. *et al.* Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. **Cell Biochem Funct**, v. 27, n. 6, p. 378-382, ago. 2009. doi:10.1002/cbf.1585.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th ed. **Oxford University Press**, out. 2015.
doi:1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.

HAYFLICK, L. How and why we age. **Exp Gerontol**, v. 33, n. 7-8, p. 639-653, nov. 1998. doi:10.1016/s0531-5565(98)00023-0.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008. doi:1590/S0100-40422008000500046.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Projeções da população: Brasil e unidades da federação: revisão 2018. Rio de Janeiro, **IBGE**, 2018. Disponível em:
<ftp://ftp.ibge.gov.br/Projecao_da_Populacao/Projecao_da_Populacao_2018/projecoes_2018_populacao_2010_2060.xls>. Acesso em: 01 mar. 2020.

INTERNATIONAL STEREOLOGY SOCIETY. Disponível em:
<<http://stereologysociety.org/about.html>>. Acesso em: 01 mar. 2020.

JASSAL, S.V.; OREOPOULOS, D.G. The aging kidney. **Geriatr Nephrol Urol**, v. 8, n. 3, p. 141-147, 1998. doi:10.1023/a:1008316016640.

JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal Biochem**, v. 202, n. 2, p. 384-389, mai 1992. doi:10.1016/0003-2697(92)90122-n.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**. v. 26, n. 10, p.853-856, out. 1991.
doi:10.1007/bf02536169.

JIN, K. Modern Biological Theories of Aging. **Aging Dis**, v. 1, n. 2, p. 72-74, out. 2010. PMID:21132086.

JUNG, K.; HENKE, W. Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. **Free Radic Biol Med**, v. 20, n. 4, p. 613-617, jan. 1996.
doi:10.1016/0891-5849(95)02090-x.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2008. p. 524.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1ª edição. São Paulo: Livraria e Editora Santos; 1983. p. 123.

KARBALAY-DOUST, S.; NOORAFSHAN, A.; POURSHAHID, S.M. Taxol and taurine protect the renal tissue of rats after unilateral ureteral obstruction: a stereological survey. **Korean J Urol**, v. 53, n. 5, p. 360-367, 2012. doi:10.4111/kju.2012.53.5.360.

KÜCHEMANN, B.A. Envelhecimento populacional, cuidado e cidadania: velhos dilemas e novos desafios. **Soc estado**, v. 27, n. 1, p. 165-180, abr. 2012. doi:10.1590/s0102-69922012000100010.

LEVINE, R.L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-357, 1994. doi:10.1016/s0076-6879(94)33040-9.

LIMA-COSTA, M.F.; VERAS, R. Saúde Pública e envelhecimento. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 3, p. 700-701, jun. 2003. doi:10.1590/s0102-311x2003000300001.

LIMPERT, E.; STAHEL, W.A. Problems with using the normal distribution and ways to improve quality and efficiency of data analysis. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21403, jul. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0021403.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Fisiologia e fisiopatologia: estereologia do rim: determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo. **J Bras Nefrol**, v. 22, n. 2, p. 103-109, 2000.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-486, dez. 2003. doi:10.1590/s0001-37652003000400006.

MATTFELDT, T.; MOBIUS, H.J.; MALL, G. Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects unknown orientation in space. **J Microsc**, v. 139, n. 3, p. 279-289, set. 1985. doi:10.1111/j.1365-2818.1985.tb02644.x.

MEDEIROS, F.J.; AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Renal cortex remodeling in streptozotocin-induced diabetic spontaneously hypertensive rats treated with olive oil, palm oil and fish oil from Menhaden. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 75, n. 6, p. 357-365, dez. 2006. doi:10.1016/j.plefa.2006.06.007.

MELCHIORETTO, E.F.; ZENI, M.; VERONEZ, D.A.L.; MARTINS FILHO, E.L.; DE FRAGA, R. Quantitative analysis of the renal aging in rats. Stereological study. **Acta Cir Bras**, v. 31, n. 5, p.346-352, may. 2016. doi:10.1590/S0102-865020160050000009.

MOREIRA, M.M. O envelhecimento da população brasileira em nível regional: 1940-2050. In: XI Encontro nacional de estudos populacionais da Associação Brasileira de Estudos Populacionais, 1998, Caxambú/Minas Gerais. **Anais do XI Encontro nacional de estudos populacionais da Associação Brasileira de Estudos Populacionais**. Belo Horizonte/Brasil: ABEP, 1998, p. 3030-3124.

NEVES, S.M.P.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E.W. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo, 2013. doi:10.11606/9788585285098.

NÚÑEZ, M.E.; HALL, D.B.; BARTON, J.K. Long-range oxidative damage to DNA: effects of distance and sequence. **Chem Biol**, v. 6, n. 2, p. 85-97, fev. 1999. doi:10.1016/S1074-5521(99)80005-2.

NYENGAARD, J.R. Stereologic methods and their application in kidney research. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 5, p. 1100-1123, mai. 1999. PMID: 10232698.

OWEN, R.A.; HEYWOOD, R. Age-related variations in renal structure and function in Sprague–Dawley rats. **Toxicol Pathol**, v. 14, n. 2, p. 158-167, fev. 1986. doi:10.1177/019262338601400203.

PANNARALE, G. *et al.* The aging kidney: structural changes. **J Nephrol**, v. 23, suppl 15, p. S37-40, set-out. 2010. PMID: 20872369.

PAPALÉO NETTO, M. **O Estudo da velhice: Histórico, definição do campo e termos básicos** In: FREITAS, E.; PY, L. (Ed.). Tratado de Geriatria e Gerontologia. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 3-13.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-777, jun. 2005. doi:10.1016/j.nut.2005.04.002.

RAY, P.D.; HUANG, B.W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p. 981-990, mai. 2012. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008.

RIKANS, L.E.; HORNBROOK, K.R. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. **Biochim Biophys Acta**, v. 1362, n. 2-3, p.116-127, dez. 1997. doi:10.1016/s0925-4439(97)00067-7.

SAMPAIO, K.M.O.R.; ARAÚJO, R.B. Ultrasonographic measurement of linear characteristics and renal volumetry in dogs. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 54, n. 3, p.248-254, jun. 2002. doi:10.1590/S0102-09352002000300005.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, p. 192-205, 1968. doi:10.1016/0003-2697(68)90092-4.

SESSO, R.; GORDAN, P. Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil. **J Bras Nefrol**, v. 29, suppl. 1, p. 9-12, 2007.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, v. 91, n. 3, p. s31-s38, set. 1991. doi:10.1016/0002-9343(91)90281-2.

SILVA, F.G. The aging kidney: a review – part I. **Int Urol Nephrol**, v. 37, n. 1, p.185-205, mar. 2005. doi:10.1007/s11255-004-0873-6.

SOHAL, R.S.; ARNOLD, L.A.; SOHAL, B.H. Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. **Free Radic Biol Med**, v. 9, n. 6, p. 495-500, jan. 1990. doi:10.1016/0891-5849(90)90127-5.

SOSZYŃSKI, M.; BARTOSZ, G. Decrease in accessible thiols as an index of oxidative damage to membrane proteins. **Free Radic Biol Med**, v. 23, n. 3, p. 463-469, 1997. doi:10.1016/s0891-5849(97)00117-2.

STERIO, D.C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **J Microsc**, v. 134, n. 2, p.127-136, mai. 1984. doi:10.1111/j.1365-2818.1984.tb02501.x.

SUZUKI, Y.J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D.A. Protein carbonylation. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 3, p. 323-325, fev. 2010. doi:10.1089/ars.2009.2887.

TAKEDA, T. *et al.* Age-related changes in morphological studies in rat and human kidney. **Nihon Jinzo Gakkai Shi**, v. 38, n. 12, p. 555-562, dez. 1996. PMID:9014474.

TRUELSEN, T.; BONITA, R.; JAMROZIK, K. Surveillance of stroke: a global perspective. **Int J Epidemiol**, v. 30, suppl. 1, p. s11-s16, out. 2001. doi:10.1093/ije/30.suppl_1.s11.

UZUN, D. *et al.* Oxidative damage parameters in renal tissues of aged and young rats based on gender. **Clin Interv Aging**, v. 8, n. 1, p. 809-815, jun. 2013. doi:10.2147/CIA.S46188.

VAN HEEMST, D. Insulin, IGF-1 and longevity. **Aging Dis**, v. 1, n. 2, p. 147-157, out. 2010. PMID:22396862.

VAN ZUTPHEN, L.F. Use of animals in research: a science - society controversy? The European perspective. **ALTEX**, v. 19, n. 3, p. 140-144, mar. 2002. PMID:12165817.

VERAS, R. Population aging today: demands, challenges and innovations. **Rev Saude Publica**, v. 43, n. 3, p. 548-554, jun. 2009. doi:10.1590/S0034-89102009005000025.

WARNER, H.R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radic. Biol. Med**, v. 17, n. 3, p. 249-258, set. 1994. doi:10.1016/0891-5849(94)90080-9.

WEIBEL, E.R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **J Cell Biol**, v. 30, n. 1, p. 23-38, jul. 1966. doi:10.1083/jcb.30.1.23.

WINTOUR, E.M. *et al.* Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. **J Physiol**, v. 549, n. 3, p. 929-935, jun. 2003. doi:10.1113/jphysiol.2003.042408.

ZEIER, M. *et al.* Effects of testosterone on glomerular growth after uninephrectomy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 13, n. 9, p.2234-2240, 1 set. 1998. doi:10.1093/ndt/13.9.2234.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. MANUAL DE NORMALIZAÇÃO DE DOCUMENTOS CIENTÍFICOS de acordo com as normas da ABNT. Editora UFPR, 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. Orientação para normalização de trabalhos acadêmicos. Última atualização: 15 de abril de 2018. <https://www.portal.ufpr.br/tutoriais/tutoriais_normaliza/modelo_trabalho_academico.pdf>. Último acesso em: 08/02/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – Faculdade de Ciências Médicas. Normas, Procedimentos e Orientações para publicação de dissertações e teses da Faculdade de Ciências Médicas. UNICAMP, 2019. Disponível em: <<https://www.fcm.unicamp.br/fcm/pos-graduacao/defesa/manual-de-dissertacoes-e-teses>>. Último acesso em: 08/02/2020.

PUBMED: a service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Último acesso em: 08/02/2020.

DeCS-BVS: Descritores em Ciências da Saúde – Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/>>. Último acesso em: 08/02/2020.

Dicionário Priberam da Língua Portuguesa. Disponível em <<http://www.priberam.pt/DLPO/>>. Último acesso em: 08/02/2020.

APÊNDICE 1 - DADOS DA MORFOMETRIA

| GRUPO 3 MESES | Rato 1 | Rato 2 | Rato 3 | Rato 4 | Rato 5 | Rato 6 | Rato 7 | Rato 8 | Rato 9 | Rato 10 | Rato 11 | Rato 12 |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| Peso do Animal (g) | 376 | 408 | 383 | 353 | 328 | 343 | 386 | 376 | 396 | 438 | 367 | 395 |
| Estatura do Animal (cm) | 21 | 24 | 22,5 | 21,5 | 21 | 22 | 23,5 | 23,5 | 22,5 | 24 | 22 | 21 |
| Peso do Rim Direito (g) | 0,97 | 1,44 | 1,33 | 1,17 | 1,32 | 1,15 | 1,3 | 1,28 | 1,26 | 1,43 | 1,31 | 1,38 |
| Comprimento Rim Direito (cm) | 1,4 | 1,6 | 1,7 | 1,4 | 1,5 | 1,4 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Largura Rim Direito (cm) | 0,9 | 1,1 | 1,1 | 0,9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Espessura Rim Direito (cm) | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,5 |
| Volume do Rim Direito (mm3) | 329,49 | 552,28 | 586,8 | 395,38 | 392,25 | 439,32 | 392,25 | 470,7 | 392,25 | 470,7 | 392,25 | 392,25 |

| GRUPO 6 MESES | Rato 13 | Rato 14 | Rato 15 | Rato 16 | Rato 17 | Rato 18 | Rato 19 | Rato 20 | Rato 21 | Rato 22 | Rato 23 | Rato 24 |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Peso do Animal (g) | 499 | 422 | 422 | 406 | 555 | 481 | 453 | 404 | 432 | 494 | 445 | 476 |
| Estatura do Animal (cm) | 23,5 | 24 | 25 | 23 | 26,5 | 25,5 | 23,7 | 23,5 | 23,1 | 24,2 | 25 | 23,4 |
| Peso do Rim Direito (g) | 1,41 | 1,48 | 1,28 | 1,34 | 1,75 | 1,4 | 1,52 | 1,35 | 1,5 | 1,65 | 1,59 | 1,64 |
| Comprimento Rim Direito (cm) | 2,04 | 2,02 | 2 | 1,98 | 2,09 | 2 | 2,03 | 1,98 | 1,89 | 1,92 | 2,09 | 2,02 |
| Largura Rim Direito (cm) | 1,32 | 1,37 | 1,28 | 1,28 | 1,42 | 1,32 | 1,24 | 1,24 | 1,25 | 1,3 | 1,28 | 1,43 |
| Espessura Rim Direito (cm) | 0,84 | 0,84 | 0,81 | 8,4 | 0,78 | 0,74 | 0,76 | 0,82 | 0,84 | 0,89 | 0,85 | 0,81 |
| Volume do Rim Direito (mm3) | 1183 | 1215,77 | 1084,49 | 1113,41 | 1210,68 | 1021,73 | 1000,53 | 1052,93 | 1037,89 | 1161,81 | 1189,26 | 1223,69 |

| GRUPO 9 MESES | Rato 25 | Rato 26 | Rato 27 | Rato 28 | Rato 29 | Rato 30 | Rato 31 | Rato 32 | Rato 33 | Rato 34 | Rato 35 | Rato 36 |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Peso do Animal (g) | 481 | 509 | 474 | 543 | 464 | 589 | 471 | 473 | 531 | 551 | 537 | 545 |
| Estatura do Animal (cm) | 26,8 | 27 | 27,5 | 27,5 | 25 | 27 | 25,5 | 26 | 26,5 | 28 | 26,5 | 27,5 |
| Peso do Rim Direito (g) | 1,16 | 1,26 | 1,29 | 1,42 | 1,3 | 1,67 | 1,29 | 1,07 | 1,34 | 1,33 | 1,54 | 1,46 |
| Comprimento Rim Direito (cm) | 1,92 | 1,98 | 1,95 | 2,04 | 2,02 | 2,15 | 2 | 1,75 | 2,05 | 2,05 | 2,05 | 1,95 |
| Largura Rim Direito (cm) | 1,29 | 1,23 | 1,23 | 1,45 | 1,28 | 1,35 | 1,2 | 1,2 | 1,4 | 1,2 | 1,35 | 1,3 |
| Espessura Rim Direito (cm) | 0,75 | 0,78 | 0,79 | 0,77 | 0,82 | 0,85 | 0,7 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,85 | 0,85 |
| Volume do Rim Direito (mm3) | 971,52 | 993,49 | 990,98 | 1191,21 | 1108,86 | 129,3 | 878,64 | 823,72 | 1125,75 | 964,93 | 1230,29 | 1126,93 |

| GRUPO 12 MESES | Rato 37 | Rato 38 | Rato 39 | Rato 40 | Rato 41 | Rato 42 | Rato 43 | Rato 44 | Rato 45 | Rato 46 | Rato 47 | Rato 48 |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Peso do Animal (g) | 592 | 564 | 510 | 575 | 610 | 573 | 562 | 540 | 549 | 586 | 520 | 485 |
| Estatura do Animal (cm) | 30 | 27,5 | 29 | 26,5 | 28 | 27 | 27,5 | 24 | 26,5 | 26 | 26 | 26 |
| Peso do Rim Direito (g) | 1,72 | 1,7 | 1,33 | 1,4 | 1,48 | 1,54 | 1,32 | 1,35 | 1,36 | 1,64 | 1,55 | 1,43 |
| Comprimento Rim Direito (cm) | 2,1 | 2,1 | 1,9 | 2,1 | 2 | 2 | 2 | 1,9 | 2 | 2,1 | 2,1 | 2 |
| Largura Rim Direito (cm) | 1,35 | 1,4 | 1,25 | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 1,3 | 1,35 | 1,3 | 1,4 | 1,3 | 1,4 |
| Espessura Rim Direito (cm) | 0,9 | 0,9 | 0,85 | 0,9 | 0,85 | 1 | 0,9 | 0,85 | 0,8 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| Volume do Rim Direito (mm3) | 1334,43 | 1383,85 | 1055,8 | 1285,01 | 1244,74 | 1464,4 | 1223,82 | 1140,27 | 1087,84 | 1383,85 | 1285,01 | 1317,96 |

| GRUPO 18 MESES | Rato 49 | Rato 50 | Rato 51 | Rato 52 | Rato 53 | Rato 54 | Rato 55 | Rato 56 | Rato 57 | Rato 58 | Rato 59 | Rato 60 |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Peso do Animal (g) | 592 | 470 | 441 | 573 | 520 | 673 | 412 | 478 | 570 | 618 | 531 | 634 |
| Estatura do Animal (cm) | 29 | 26 | 26 | 27 | 27 | 28 | 27 | 28 | 29 | 26 | 26 | 28 |
| Peso do Rim Direito (g) | 1,52 | 1,64 | 1,23 | 1,54 | 1,59 | 1,72 | 2,07 | 1,58 | 1,6 | 1,65 | 1,44 | 1,45 |
| Comprimento Rim Direito (cm) | 1,7 | 1,8 | 1,5 | 1,7 | 1,9 | 1,7 | 1,9 | 1,7 | 1,8 | 1,8 | 1,7 | 1,6 |
| Largura Rim Direito (cm) | 1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1 | 1 | 1,1 | 1 | 1 | 1 |
| Espessura Rim Direito (cm) | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,7 | 0,9 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,5 |
| Volume do Rim Direito (mm3) | 533,46 | 621,32 | 431,47 | 586,8 | 655,84 | 746,84 | 894,33 | 533,46 | 517,77 | 564,84 | 444,55 | 418,4 |

| GRUPO 24 MESES | Rato 61 | Rato 62 | Rato 63 | Rato 64 | Rato 65 | Rato 66 | Rato 67 | Rato 68 | Rato 69 | Rato 70 | Rato 71 | Rato 72 |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Peso do Animal (g) | 532 | 580 | 539 | 616 | 456 | 561 | 527 | 469 | 469 | 612 | 464 | 460 |
| Estatura do Animal (cm) | 26 | 26 | 24 | 28 | 26 | 26 | 25 | 26 | 24 | 26 | 25 | 24 |
| Peso do Rim Direito (g) | 1,66 | 1,27 | 1,92 | 1,34 | 1,45 | 1,6 | 1,34 | 2,18 | 1,5 | 1,44 | 1,37 | 1,33 |
| Comprimento Rim Direito (cm) | 1,6 | 1,6 | 1,9 | 1,7 | 1,5 | 1,7 | 1,6 | 2 | 1,8 | 1,1 | 1,5 | 1,6 |
| Largura Rim Direito (cm) | 1 | 0,9 | 1,1 | 0,9 | 1 | 1,1 | 1 | 1,2 | 0,9 | 1 | 1 | 1 |
| Espessura Rim Direito (cm) | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,5 |
| Volume do Rim Direito (mm3) | 502,08 | 376,56 | 655,84 | 480,11 | 470,7 | 586,8 | 418,4 | 753,12 | 508,35 | 345,18 | 392,25 | 418,4 |

APÊNDICE 2 - DADOS DA ESTEREOLOGIA

| GRUPO 3 MESES | | | | |
|---------------|----|-------------|-------------------------------|------------------------------|
| LÂMINAS | P | Vv[glom](%) | Nv[glom] (1/mm ³) | Vol[glom] (μm ³) |
| r1 1 | 54 | 12,857 | 156,42 | 8,22 |
| r1 2 | 52 | 12,381 | 156,42 | 7,92 |
| r1 3 | 50 | 11,905 | 166,11 | 7,17 |
| r1 4 | 52 | 12,381 | 166,11 | 7,45 |
| r1 5 | 59 | 14,048 | 157,12 | 8,94 |
| r2 1 | 58 | 13,810 | 170,96 | 8,08 |
| r2 2 | 52 | 12,381 | 156,42 | 7,92 |
| r2 3 | 62 | 14,762 | 186,19 | 7,93 |
| r2 4 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r2 5 | 59 | 14,048 | 157,12 | 8,94 |
| r3 1 | 49 | 11,667 | 161,27 | 7,23 |
| r3 2 | 58 | 13,810 | 160,89 | 8,58 |
| r3 3 | 54 | 12,857 | 170,96 | 7,52 |
| r3 4 | 59 | 14,048 | 157,12 | 8,94 |
| r3 5 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r4 1 | 62 | 14,762 | 186,19 | 7,93 |
| r4 2 | 49 | 11,667 | 161,27 | 7,23 |
| r4 3 | 59 | 14,048 | 157,12 | 8,94 |
| r4 4 | 58 | 13,810 | 160,89 | 8,58 |
| r4 5 | 54 | 12,857 | 170,96 | 7,52 |
| r5 1 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r5 2 | 59 | 14,048 | 157,12 | 8,94 |
| r5 3 | 49 | 11,667 | 161,27 | 7,23 |
| r5 4 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r5 5 | 58 | 13,810 | 160,89 | 8,58 |
| r6 1 | 54 | 12,857 | 170,96 | 7,52 |
| r6 2 | 52 | 12,381 | 160,89 | 7,70 |
| r6 3 | 59 | 14,048 | 157,12 | 8,94 |
| r6 4 | 62 | 14,762 | 186,19 | 7,93 |
| r6 5 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r7 1 | 50 | 11,905 | 166,11 | 7,17 |
| r7 2 | 52 | 12,381 | 156,42 | 7,92 |
| r7 3 | 54 | 12,857 | 170,96 | 7,52 |
| r7 4 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r7 5 | 52 | 12,381 | 166,11 | 7,45 |
| r8 1 | 50 | 11,905 | 166,11 | 7,17 |
| r8 2 | 49 | 11,667 | 161,27 | 7,23 |
| r8 3 | 58 | 13,810 | 170,96 | 8,08 |
| r8 4 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r8 5 | 53 | 12,619 | 164,04 | 7,69 |
| r9 1 | 62 | 14,762 | 186,19 | 7,93 |
| r9 2 | 54 | 12,857 | 170,96 | 7,52 |
| r9 3 | 50 | 11,905 | 166,11 | 7,17 |
| r9 4 | 52 | 12,381 | 160,89 | 7,70 |
| r9 5 | 59 | 14,048 | 157,12 | 8,94 |
| r10 1 | 62 | 14,762 | 186,19 | 7,93 |
| r10 2 | 52 | 12,381 | 156,42 | 7,92 |
| r10 3 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r10 4 | 62 | 14,762 | 186,19 | 7,93 |
| r10 5 | 50 | 11,905 | 166,11 | 7,17 |
| r11 1 | 53 | 12,619 | 164,04 | 7,69 |
| r11 2 | 54 | 12,857 | 170,96 | 7,52 |
| r11 3 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r11 4 | 52 | 12,381 | 160,89 | 7,70 |
| r11 5 | 54 | 12,857 | 170,96 | 7,52 |
| r12 1 | 50 | 11,905 | 166,11 | 7,17 |
| r12 2 | 62 | 14,762 | 186,19 | 7,93 |
| r12 3 | 59 | 14,048 | 157,12 | 8,94 |
| r12 4 | 52 | 12,381 | 160,89 | 7,70 |
| r12 5 | 58 | 13,810 | 160,89 | 8,58 |

| GRUPO 6 MESES | | | | |
|---------------|----|-------------|-------------------------------|------------------------------|
| LÂMINAS | P | Vv[glom](%) | Nv[glom] (1/mm ³) | Vol[glom] (μm ³) |
| r13 1 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r13 2 | 41 | 9,762 | 141,20 | 6,91 |
| r13 3 | 53 | 12,619 | 164,04 | 7,69 |
| r13 4 | 42 | 10,000 | 113,85 | 8,78 |
| r13 5 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r14 1 | 52 | 12,381 | 155,04 | 7,99 |
| r14 2 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r14 3 | 47 | 11,190 | 155,04 | 7,22 |
| r14 4 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r14 5 | 43 | 10,238 | 134,97 | 7,59 |
| r15 1 | 53 | 12,619 | 164,04 | 7,69 |
| r15 2 | 41 | 9,762 | 141,20 | 6,91 |
| r15 3 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r15 4 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r15 5 | 53 | 12,619 | 164,04 | 7,69 |
| r16 1 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r16 2 | 52 | 12,381 | 155,04 | 7,99 |
| r16 3 | 41 | 9,762 | 134,97 | 7,23 |
| r16 4 | 43 | 10,238 | 134,97 | 7,59 |
| r16 5 | 40 | 9,524 | 134,97 | 7,06 |
| r17 1 | 44 | 10,476 | 139,12 | 7,53 |
| r17 2 | 53 | 12,619 | 164,04 | 7,69 |
| r17 3 | 41 | 9,762 | 139,12 | 7,02 |
| r17 4 | 45 | 10,714 | 133,58 | 8,02 |
| r17 5 | 42 | 10,000 | 139,12 | 7,19 |
| r18 1 | 45 | 10,714 | 133,58 | 8,02 |
| r18 2 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r18 3 | 53 | 12,619 | 164,04 | 7,69 |
| r18 4 | 42 | 10,000 | 113,85 | 8,78 |
| r18 5 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r19 1 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r19 2 | 38 | 9,048 | 119,05 | 7,60 |
| r19 3 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r19 4 | 38 | 9,048 | 119,05 | 7,60 |
| r19 5 | 41 | 9,762 | 119,05 | 8,20 |
| r20 1 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r20 2 | 39 | 9,286 | 113,85 | 8,16 |
| r20 3 | 28 | 6,667 | 113,85 | 5,86 |
| r20 4 | 42 | 10,000 | 113,85 | 8,78 |
| r20 5 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r21 1 | 41 | 9,762 | 141,20 | 6,91 |
| r21 2 | 46 | 10,952 | 141,20 | 7,76 |
| r21 3 | 45 | 10,714 | 1335,83 | 8,02 |
| r21 4 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r21 5 | 52 | 12,381 | 160,89 | 7,70 |
| r22 1 | 58 | 13,810 | 160,89 | 8,58 |
| r22 2 | 42 | 10,000 | 113,85 | 8,78 |
| r22 3 | 44 | 10,476 | 113,85 | 9,20 |
| r22 4 | 45 | 10,714 | 133,58 | 8,02 |
| r22 5 | 39 | 9,286 | 155,04 | 5,99 |
| r23 1 | 58 | 13,810 | 160,89 | 8,58 |
| r23 2 | 42 | 10,000 | 113,85 | 8,78 |
| r23 3 | 46 | 10,952 | 141,20 | 7,76 |
| r23 4 | 39 | 9,286 | 141,20 | 6,58 |
| r23 5 | 41 | 9,762 | 141,20 | 6,91 |
| r24 1 | 40 | 9,524 | 160,89 | 5,92 |
| r24 2 | 44 | 10,476 | 160,89 | 6,51 |
| r24 3 | 49 | 11,667 | 160,89 | 7,25 |
| r24 4 | 52 | 12,381 | 160,89 | 7,70 |
| r24 5 | 58 | 13,810 | 160,89 | 8,58 |

continua

| GRUPO 9 MESES | | | | |
|---------------|----|-------------|------------------|-----------------|
| LÁMINAS | P | Vv[glom](%) | Nv[glom] (1/mm3) | Vol[glom] (µm3) |
| r25 1 | 49 | 11,667 | 161,27 | 7,23 |
| r25 2 | 45 | 10,714 | 161,27 | 6,64 |
| r25 3 | 42 | 10,000 | 161,27 | 6,20 |
| r25 4 | 48 | 11,429 | 161,27 | 7,09 |
| r25 5 | 49 | 11,667 | 161,27 | 7,23 |
| r26 1 | 52 | 12,381 | 155,04 | 7,99 |
| r26 2 | 44 | 10,476 | 155,04 | 6,76 |
| r26 3 | 47 | 11,190 | 155,04 | 7,22 |
| r26 4 | 42 | 10,000 | 155,04 | 6,45 |
| r26 5 | 30 | 7,143 | 133,58 | 5,35 |
| r27 1 | 37 | 8,810 | 133,58 | 6,60 |
| r27 2 | 39 | 9,286 | 133,58 | 6,95 |
| r27 3 | 42 | 10,000 | 133,58 | 7,49 |
| r27 4 | 32 | 7,619 | 119,05 | 6,40 |
| r27 5 | 30 | 7,143 | 119,05 | 6,00 |
| r28 1 | 44 | 10,476 | 155,04 | 6,76 |
| r28 2 | 47 | 11,190 | 155,04 | 7,22 |
| r28 3 | 42 | 10,000 | 155,04 | 6,45 |
| r28 4 | 39 | 9,286 | 155,04 | 5,99 |
| r28 5 | 53 | 12,619 | 164,04 | 7,69 |
| r29 1 | 44 | 10,476 | 164,04 | 6,39 |
| r29 2 | 41 | 9,762 | 164,04 | 5,95 |
| r29 3 | 57 | 13,571 | 164,04 | 8,27 |
| r29 4 | 42 | 10,000 | 164,04 | 6,10 |
| r29 5 | 32 | 7,619 | 134,97 | 5,65 |
| r30 1 | 39 | 9,286 | 134,97 | 6,88 |
| r30 2 | 35 | 8,333 | 139,12 | 5,99 |
| r30 3 | 44 | 10,476 | 157,12 | 6,67 |
| r30 4 | 46 | 10,952 | 157,12 | 6,94 |
| r30 5 | 38 | 9,048 | 157,12 | 5,76 |
| r31 1 | 40 | 9,524 | 157,12 | 6,06 |
| r31 2 | 46 | 10,952 | 170,96 | 6,41 |
| r31 3 | 37 | 8,810 | 170,96 | 5,15 |
| r31 4 | 54 | 12,857 | 170,96 | 7,52 |
| r31 5 | 38 | 9,048 | 130,12 | 6,95 |
| r32 1 | 36 | 8,571 | 130,12 | 6,59 |
| r32 2 | 33 | 7,857 | 130,12 | 6,04 |
| r32 3 | 39 | 9,286 | 130,12 | 7,14 |
| r32 4 | 42 | 10,000 | 130,12 | 7,69 |
| r32 5 | 44 | 10,476 | 166,11 | 6,31 |
| r33 1 | 38 | 9,048 | 156,42 | 5,78 |
| r33 2 | 52 | 12,381 | 170,96 | 7,24 |
| r33 3 | 59 | 14,048 | 186,19 | 7,55 |
| r33 4 | 52 | 12,381 | 186,19 | 6,65 |
| r33 5 | 49 | 11,667 | 186,19 | 6,27 |
| r34 1 | 38 | 9,048 | 130,12 | 6,95 |
| r34 2 | 34 | 8,095 | 130,12 | 6,22 |
| r34 3 | 39 | 9,286 | 130,12 | 7,14 |
| r34 4 | 37 | 8,810 | 130,12 | 6,77 |
| r34 5 | 40 | 9,524 | 130,12 | 7,32 |
| r35 1 | 48 | 11,429 | 156,42 | 7,31 |
| r35 2 | 39 | 9,286 | 121,12 | 7,67 |
| r35 3 | 44 | 10,476 | 145,35 | 7,21 |
| r35 4 | 44 | 10,476 | 145,35 | 7,21 |
| r35 5 | 47 | 11,190 | 186,19 | 6,01 |
| r36 1 | 37 | 0,881 | 141,20 | 6,24 |
| r36 2 | 41 | 9,762 | 141,20 | 6,91 |
| r36 3 | 31 | 7,381 | 114,20 | 6,46 |
| r36 4 | 29 | 6,905 | 114,20 | 6,05 |
| r36 5 | 26 | 6,190 | 114,20 | 5,42 |

| GRUPO 12 MESES | | | | |
|----------------|----|-------------|------------------|-----------------|
| LÁMINAS | P | Vv[glom](%) | Nv[glom] (1/mm3) | Vol[glom] (µm3) |
| r37 1 | 41 | 9,762 | 114,20 | 8,55 |
| r37 2 | 38 | 9,048 | 114,20 | 7,92 |
| r37 3 | 34 | 8,095 | 122,51 | 6,61 |
| r37 4 | 38 | 9,048 | 145,35 | 6,23 |
| r37 5 | 46 | 10,952 | 145,35 | 7,53 |
| r38 1 | 32 | 7,619 | 122,51 | 6,22 |
| r38 2 | 38 | 9,048 | 145,35 | 6,23 |
| r38 3 | 36 | 8,571 | 114,20 | 7,51 |
| r38 4 | 32 | 7,619 | 114,20 | 6,67 |
| r38 5 | 36 | 8,571 | 114,20 | 7,51 |
| r39 1 | 29 | 6,905 | 114,20 | 6,05 |
| r39 2 | 32 | 7,619 | 114,20 | 6,67 |
| r39 3 | 34 | 8,095 | 122,51 | 6,61 |
| r39 4 | 29 | 6,905 | 122,51 | 5,64 |
| r39 5 | 32 | 7,619 | 122,51 | 6,22 |
| r40 1 | 43 | 10,238 | 122,51 | 8,36 |
| r40 2 | 39 | 9,286 | 122,51 | 7,58 |
| r40 3 | 26 | 6,190 | 112,13 | 5,52 |
| r40 4 | 28 | 6,667 | 112,13 | 5,95 |
| r40 5 | 36 | 8,571 | 112,13 | 7,64 |
| r41 1 | 33 | 7,857 | 112,13 | 7,00 |
| r41 2 | 28 | 6,667 | 112,13 | 5,95 |
| r41 3 | 26 | 6,190 | 79,80 | 7,76 |
| r41 4 | 17 | 4,048 | 79,80 | 5,07 |
| r41 5 | 24 | 5,714 | 79,80 | 7,16 |
| r42 1 | 34 | 8,095 | 122,51 | 6,61 |
| r42 2 | 19 | 4,524 | 79,80 | 5,67 |
| r42 3 | 20 | 4,762 | 65,75 | 7,24 |
| r42 4 | 16 | 3,810 | 65,75 | 5,79 |
| r42 5 | 21 | 5,000 | 65,75 | 7,60 |
| r43 1 | 14 | 3,334 | 65,75 | 5,07 |
| r43 2 | 28 | 6,667 | 112,13 | 5,95 |
| r43 3 | 28 | 6,667 | 114,20 | 5,83 |
| r43 4 | 30 | 7,143 | 114,20 | 6,25 |
| r43 5 | 34 | 8,095 | 122,51 | 6,61 |
| r44 1 | 36 | 8,571 | 114,20 | 7,51 |
| r44 2 | 29 | 6,905 | 114,20 | 6,05 |
| r44 3 | 22 | 5,238 | 73,37 | 7,14 |
| r44 4 | 28 | 6,667 | 112,13 | 5,95 |
| r44 5 | 16 | 3,810 | 73,37 | 5,19 |
| r45 1 | 14 | 3,334 | 73,37 | 4,54 |
| r45 2 | 34 | 8,095 | 122,51 | 6,61 |
| r45 3 | 22 | 5,238 | 73,37 | 7,14 |
| r45 4 | 28 | 6,667 | 112,13 | 5,95 |
| r45 5 | 16 | 3,810 | 73,37 | 5,19 |
| r46 1 | 14 | 3,334 | 73,37 | 4,54 |
| r46 2 | 34 | 8,095 | 122,51 | 6,61 |
| r46 3 | 28 | 6,667 | 112,13 | 5,95 |
| r46 4 | 28 | 6,667 | 112,13 | 5,95 |
| r46 5 | 31 | 7,381 | 114,20 | 6,46 |
| r47 1 | 29 | 6,905 | 114,20 | 6,05 |
| r47 2 | 26 | 6,190 | 114,20 | 5,42 |
| r47 3 | 41 | 9,762 | 114,20 | 8,55 |
| r47 4 | 38 | 9,048 | 114,20 | 7,92 |
| r47 5 | 34 | 8,095 | 122,51 | 6,61 |
| r48 1 | 38 | 9,048 | 145,35 | 6,23 |
| r48 2 | 16 | 3,810 | 73,37 | 5,19 |
| r48 3 | 14 | 3,334 | 73,37 | 4,54 |
| r48 4 | 29 | 6,905 | 114,20 | 6,05 |
| r48 5 | 22 | 5,238 | 73,37 | 7,14 |

continua

| GRUPO 18 MESES | | | | |
|----------------|----|-------------|------------------|-----------------|
| LÁMINAS | P | Vv[glom](%) | Nv[glom] (1/mm3) | Vol[glom] (µm3) |
| r49 1 | 19 | 4,524 | 54,68 | 8,27 |
| r49 2 | 17 | 4,048 | 74,06 | 5,47 |
| r49 3 | 21 | 5,000 | 74,06 | 6,75 |
| r49 4 | 24 | 5,714 | 74,06 | 7,72 |
| r49 5 | 21 | 5,000 | 74,06 | 6,75 |
| r50 1 | 19 | 4,524 | 77,52 | 5,84 |
| r50 2 | 18 | 4,286 | 59,52 | 7,20 |
| r50 3 | 16 | 3,810 | 59,52 | 6,40 |
| r50 4 | 19 | 4,524 | 59,52 | 7,60 |
| r50 5 | 16 | 3,810 | 59,52 | 6,40 |
| r51 1 | 17 | 4,048 | 59,52 | 6,80 |
| r51 2 | 22 | 5,238 | 92,75 | 5,65 |
| r51 3 | 21 | 5,000 | 74,06 | 6,75 |
| r51 4 | 26 | 6,190 | 92,75 | 6,67 |
| r51 5 | 28 | 6,667 | 92,75 | 7,19 |
| r52 1 | 24 | 5,714 | 92,75 | 6,16 |
| r52 2 | 16 | 3,810 | 60,22 | 6,33 |
| r52 3 | 12 | 2,857 | 60,22 | 4,74 |
| r52 4 | 16 | 3,810 | 60,22 | 6,33 |
| r52 5 | 19 | 4,524 | 60,22 | 7,51 |
| r53 1 | 24 | 5,714 | 60,22 | 9,49 |
| r53 2 | 22 | 5,238 | 113,51 | 4,61 |
| r53 3 | 34 | 8,095 | 113,51 | 7,13 |
| r53 4 | 23 | 5,476 | 95,52 | 5,73 |
| r53 5 | 15 | 3,571 | 80,98 | 4,41 |
| r54 1 | 19 | 4,524 | 80,98 | 5,59 |
| r54 2 | 16 | 3,810 | 60,22 | 6,33 |
| r54 3 | 22 | 5,238 | 80,98 | 6,47 |
| r54 4 | 26 | 6,190 | 92,75 | 6,67 |
| r54 5 | 22 | 5,238 | 100,36 | 5,22 |
| r55 1 | 19 | 4,524 | 100,36 | 4,51 |
| r55 2 | 11 | 2,619 | 53,30 | 4,91 |
| r55 3 | 12 | 2,857 | 53,30 | 5,36 |
| r55 4 | 11 | 2,619 | 53,30 | 4,91 |
| r55 5 | 16 | 3,810 | 53,30 | 7,15 |
| r56 1 | 14 | 3,334 | 61,60 | 5,41 |
| r56 2 | 14 | 3,334 | 42,22 | 7,90 |
| r56 3 | 12 | 2,857 | 42,22 | 6,77 |
| r56 4 | 16 | 3,810 | 42,22 | 9,02 |
| r56 5 | 9 | 2,143 | 42,22 | 5,08 |
| r57 1 | 10 | 2,381 | 42,22 | 5,64 |
| r57 2 | 17 | 4,048 | 64,37 | 6,29 |
| r57 3 | 16 | 3,810 | 42,22 | 9,02 |
| r57 4 | 26 | 6,190 | 106,59 | 5,81 |
| r57 5 | 19 | 4,524 | 66,45 | 6,81 |
| r58 1 | 11 | 2,619 | 53,30 | 4,91 |
| r58 2 | 16 | 3,810 | 66,45 | 5,73 |
| r58 3 | 19 | 4,524 | 66,45 | 6,81 |
| r58 4 | 22 | 5,238 | 66,45 | 7,88 |
| r58 5 | 19 | 4,524 | 66,45 | 6,81 |
| r59 1 | 20 | 4,762 | 66,45 | 7,17 |
| r59 2 | 19 | 4,524 | 61,60 | 7,34 |
| r59 3 | 21 | 5,000 | 61,60 | 8,12 |
| r59 4 | 18 | 4,286 | 61,60 | 6,96 |
| r59 5 | 17 | 4,048 | 61,60 | 6,57 |
| r60 1 | 14 | 3,334 | 61,60 | 5,41 |
| r60 2 | 16 | 3,810 | 42,22 | 9,02 |
| r60 3 | 22 | 5,238 | 75,44 | 6,94 |
| r60 4 | 19 | 4,524 | 66,45 | 6,81 |
| r60 5 | 16 | 3,810 | 66,45 | 5,73 |

| GRUPO 24 MESES | | | | |
|----------------|----|-------------|------------------|-----------------|
| LÁMINAS | P | Vv[glom](%) | Nv[glom] (1/mm3) | Vol[glom] (µm3) |
| r61 1 | 9 | 2,143 | 31,84 | 6,73 |
| r61 2 | 11 | 2,619 | 31,84 | 8,23 |
| r61 3 | 9 | 2,143 | 31,84 | 6,73 |
| r61 4 | 9 | 2,143 | 31,84 | 6,73 |
| r61 5 | 8 | 1,905 | 31,84 | 5,98 |
| r62 1 | 12 | 2,857 | 35,30 | 8,09 |
| r62 2 | 11 | 2,619 | 35,30 | 7,42 |
| r62 3 | 10 | 2,381 | 35,30 | 6,75 |
| r62 4 | 8 | 1,905 | 35,30 | 5,40 |
| r62 5 | 10 | 2,381 | 35,30 | 6,75 |
| r63 1 | 10 | 2,381 | 31,15 | 7,64 |
| r63 2 | 11 | 2,619 | 31,15 | 8,41 |
| r63 3 | 9 | 2,143 | 31,15 | 6,88 |
| r63 4 | 8 | 1,905 | 31,15 | 6,12 |
| r63 5 | 7 | 1,667 | 31,15 | 5,35 |
| r64 1 | 10 | 2,381 | 31,15 | 7,64 |
| r64 2 | 11 | 2,619 | 31,15 | 8,41 |
| r64 3 | 9 | 2,143 | 31,15 | 6,88 |
| r64 4 | 8 | 1,905 | 31,15 | 6,12 |
| r64 5 | 7 | 1,667 | 31,15 | 5,35 |
| r65 1 | 8 | 1,905 | 20,76 | 9,17 |
| r65 2 | 6 | 1,429 | 20,76 | 6,88 |
| r65 3 | 4 | 0,952 | 20,76 | 4,58 |
| r65 4 | 5 | 1,190 | 20,76 | 5,73 |
| r65 5 | 7 | 1,667 | 20,76 | 8,03 |
| r66 1 | 8 | 1,905 | 22,15 | 8,60 |
| r66 2 | 6 | 1,429 | 22,15 | 6,45 |
| r66 3 | 4 | 0,952 | 22,15 | 4,30 |
| r66 4 | 6 | 1,429 | 22,15 | 6,45 |
| r66 5 | 8 | 1,905 | 22,15 | 8,60 |
| r67 1 | 9 | 2,143 | 29,76 | 7,20 |
| r67 2 | 6 | 1,429 | 29,76 | 4,80 |
| r67 3 | 8 | 1,905 | 29,76 | 6,40 |
| r67 4 | 11 | 2,619 | 29,76 | 8,80 |
| r67 5 | 9 | 2,143 | 29,76 | 7,20 |
| r68 1 | 8 | 1,905 | 23,53 | 8,10 |
| r68 2 | 6 | 1,429 | 23,53 | 6,07 |
| r68 3 | 4 | 0,952 | 23,53 | 4,05 |
| r68 4 | 6 | 1,429 | 23,53 | 6,07 |
| r68 5 | 10 | 2,381 | 23,53 | 10,12 |
| r69 1 | 8 | 1,905 | 24,23 | 7,86 |
| r69 2 | 7 | 1,667 | 24,23 | 6,88 |
| r69 3 | 8 | 1,905 | 24,23 | 7,86 |
| r69 4 | 5 | 1,190 | 24,23 | 4,91 |
| r69 5 | 7 | 1,667 | 24,23 | 6,88 |
| r70 1 | 8 | 1,905 | 24,23 | 7,86 |
| r70 2 | 7 | 1,667 | 24,23 | 6,88 |
| r70 3 | 8 | 1,905 | 24,23 | 7,86 |
| r70 4 | 5 | 1,190 | 24,23 | 4,91 |
| r70 5 | 7 | 1,667 | 24,23 | 6,88 |
| r71 1 | 8 | 1,905 | 20,76 | 9,17 |
| r71 2 | 6 | 1,429 | 20,76 | 6,88 |
| r71 3 | 4 | 0,952 | 20,76 | 4,58 |
| r71 4 | 5 | 1,190 | 20,76 | 5,73 |
| r71 5 | 7 | 1,667 | 20,76 | 8,03 |
| r72 1 | 8 | 1,905 | 22,15 | 8,60 |
| r72 2 | 6 | 1,429 | 22,15 | 6,45 |
| r72 3 | 4 | 0,952 | 22,15 | 4,30 |
| r72 4 | 6 | 1,429 | 22,15 | 6,45 |
| r72 5 | 8 | 1,905 | 22,15 | 8,60 |

APÊNDICE 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – PESO DOS ANIMAIS

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|---------------------------|----------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| Peso do Animal (g) | 3 meses | 12 | 379,1 | 379,5 | 328 | 438 | 29,6 | |
| | 6 meses | 12 | 457,4 | 449,0 | 404 | 555 | 45,0 | |
| | 9 meses | 12 | 514,0 | 520,0 | 464 | 589 | 40,9 | |
| | 12 meses | 12 | 555,5 | 563,0 | 485 | 610 | 36,5 | |
| | 18 meses | 12 | 542,7 | 550,5 | 412 | 673 | 81,3 | |
| | 24 meses | 12 | 523,8 | 529,5 | 456 | 616 | 59,8 | <0,001 |

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

| Grupos comparados (peso dos animais) | Valor de p |
|--------------------------------------|------------|
| 3 x 6 | <0,001 |
| 3 x 9 | <0,001 |
| 3 x 12 | <0,001 |
| 3 x 18 | <0,001 |
| 3 x 24 | <0,001 |
| 6 x 9 | 0,009 |
| 6 x 12 | <0,001 |
| 6 x 18 | <0,001 |
| 6 x 24 | 0,003 |
| 9 x 12 | 0,054 |
| 9 x 18 | 0,180 |
| 9 x 24 | 0,646 |
| 12 x 18 | 0,546 |
| 12 x 24 | 0,138 |
| 18 x 24 | 0,374 |

APÊNDICE 4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – ESTATURA DOS ANIMAIS

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|--------------------------------|----------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| Estatuta do Animal (cm) | 3 meses | 12 | 22,4 | 22,3 | 21 | 24 | 1,15 | |
| | 6 meses | 12 | 24,2 | 23,9 | 23 | 26,5 | 1,08 | |
| | 9 meses | 12 | 26,7 | 26,9 | 25 | 28 | 0,89 | |
| | 12 meses | 12 | 27,0 | 26,8 | 24 | 30 | 1,57 | |
| | 18 meses | 12 | 27,3 | 27,0 | 26 | 29 | 1,14 | |
| | 24 meses | 12 | 25,5 | 26,0 | 24 | 28 | 1,17 | <0,001 |

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

| Grupos comparados (estatura dos animais) | Valor de p |
|--|------------|
| 3 x 6 | <0,001 |
| 3 x 9 | <0,001 |
| 3 x 12 | <0,001 |
| 3 x 18 | <0,001 |
| 3 x 24 | <0,001 |
| 6 x 9 | <0,001 |
| 6 x 12 | <0,001 |
| 6 x 18 | <0,001 |
| 6 x 24 | 0,009 |
| 9 x 12 | 0,583 |
| 9 x 18 | 0,288 |
| 9 x 24 | 0,013 |
| 12 x 18 | 0,606 |
| 12 x 24 | 0,003 |
| 18 x 24 | 0,001 |

APÊNDICE 5: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – PESO DO RIM DIREITO DOS ANIMAIS

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|--------------------------------|----------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| Peso do Rim Direito (g) | 3 meses | 12 | 1,28 | 1,31 | 0,97 | 1,44 | 0,13 | |
| | 6 meses | 12 | 1,49 | 1,49 | 1,28 | 1,75 | 0,14 | |
| | 9 meses | 12 | 1,34 | 1,32 | 1,07 | 1,67 | 0,16 | |
| | 12 meses | 12 | 1,49 | 1,46 | 1,32 | 1,72 | 0,14 | |
| | 18 meses | 12 | 1,59 | 1,59 | 1,23 | 2,07 | 0,20 | |
| | 24 meses | 12 | 1,53 | 1,45 | 1,27 | 2,18 | 0,27 | 0,001 |

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

| Grupos comparados (peso rim direito) | Valor de p |
|--------------------------------------|------------|
| 3 x 6 | 0,005 |
| 3 x 9 | 0,378 |
| 3 x 12 | 0,007 |
| 3 x 18 | <0,001 |
| 3 x 24 | 0,001 |
| 6 x 9 | 0,050 |
| 6 x 12 | 0,920 |
| 6 x 18 | 0,213 |
| 6 x 24 | 0,584 |
| 9 x 12 | 0,062 |
| 9 x 18 | 0,002 |
| 9 x 24 | 0,013 |
| 12 x 18 | 0,179 |
| 12 x 24 | 0,517 |
| 18 x 24 | 0,482 |

APÊNDICE 6 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – VOLUME DO RIM DIREITO DOS ANIMAIS

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|---|----------|----|--------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| Volume do Rim Direito (mm³) | 3 meses | 12 | 433,8 | 393,8 | 329,5 | 586,8 | 74,58 | |
| | 6 meses | 12 | 1124,6 | 1137,6 | 1000,5 | 1223,7 | 82,5 | |
| | 9 meses | 12 | 961,3 | 992,2 | 129,3 | 1230,3 | 289,4 | |
| | 12 meses | 12 | 1267,2 | 1285,0 | 1055,8 | 1464,4 | 124,0 | |
| | 18 meses | 12 | 579,1 | 549,2 | 418,4 | 894,3 | 137,9 | |
| | 24 meses | 12 | 492,3 | 475,4 | 345,2 | 753,1 | 120,8 | <0,001 |

*ANOVA com um fator, p<0,05

| Grupos comparados (volume rim direito) | Valor de p |
|--|------------|
| 3 x 6 | <0,001 |
| 3 x 9 | <0,001 |
| 3 x 12 | <0,001 |
| 3 x 18 | 0,025 |
| 3 x 24 | 0,360 |
| 6 x 9 | 0,012 |
| 6 x 12 | 0,028 |
| 6 x 18 | <0,001 |
| 6 x 24 | <0,001 |
| 9 x 12 | <0,001 |
| 9 x 18 | <0,001 |
| 9 x 24 | <0,001 |
| 12 x 18 | <0,001 |
| 12 x 24 | <0,001 |
| 18 x 24 | 0,176 |

APÊNDICE 7 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – DENSIDADE DE VOLUME DOS GLOMÉRULOS RENAI

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|-------------------------|----------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| Vv[glom] (%) | 3 meses | 12 | 13,18 | 13,26 | 12,62 | 13,71 | 0,37 | |
| | 6 meses | 12 | 10,72 | 10,81 | 9,38 | 11,81 | 0,66 | |
| | 9 meses | 12 | 9,94 | 10,24 | 7,81 | 11,91 | 1,15 | |
| | 12 meses | 12 | 6,90 | 6,41 | 5,24 | 9,38 | 1,32 | |
| | 18 meses | 12 | 4,50 | 4,36 | 3,10 | 5,62 | 0,83 | |
| | 24 meses | 12 | 1,82 | 1,67 | 1,43 | 2,43 | 0,35 | <0,001 |

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

| Grupos comparados (Vv[glom]) | Valor de p |
|---------------------------------|------------|
| 3 x 6 | <0,001 |
| 3 x 9 | <0,001 |
| 3 x 12 | <0,001 |
| 3 x 18 | <0,001 |
| 3 x 24 | <0,001 |
| 6 x 9 | 0,029 |
| 6 x 12 | <0,001 |
| 6 x 18 | <0,001 |
| 6 x 24 | <0,001 |
| 9 x 12 | <0,001 |
| 9 x 18 | <0,001 |
| 9 x 24 | <0,001 |
| 12 x 18 | <0,001 |
| 12 x 24 | <0,001 |
| 18 x 24 | <0,001 |

APÊNDICE 8 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – DENSIDADE NUMÉRICA DOS GLOMÉRULOS RENAI

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|--|----------|----|--------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| Nv[glom] (1/mm³) | 3 meses | 12 | 165,77 | 166,21 | 160,44 | 171,79 | 3,13 | |
| | 6 meses | 12 | 135,32 | 135,10 | 113,85 | 160,89 | 12,89 | |
| | 9 meses | 12 | 148,71 | 150,82 | 125,00 | 177,19 | 15,78 | |
| | 12 meses | 12 | 105,95 | 106,31 | 79,91 | 128,32 | 14,75 | |
| | 18 meses | 12 | 69,49 | 65,55 | 46,10 | 92,75 | 12,44 | |
| | 24 meses | 12 | 26,42 | 24,23 | 20,76 | 35,30 | 5,07 | <0,001 |

*ANOVA com um fator, p<0,05

| Grupos comparados (Nv[glom]) | Valor de p |
|---------------------------------|------------|
| 3 x 6 | <0,001 |
| 3 x 9 | 0,001 |
| 3 x 12 | <0,001 |
| 3 x 18 | <0,001 |
| 3 x 24 | <0,001 |
| 6 x 9 | 0,007 |
| 6 x 12 | <0,001 |
| 6 x 18 | <0,001 |
| 6 x 24 | <0,001 |
| 9 x 12 | <0,001 |
| 9 x 18 | <0,001 |
| 9 x 24 | <0,001 |
| 12 x 18 | <0,001 |
| 12 x 24 | <0,001 |
| 18 x 24 | <0,001 |

APÊNDICE 9 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – VOLUME MÉDIO GLOMERULAR

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|---|----------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| Vol[glom] (μm^3) | 3 meses | 12 | 7,96 | 7,99 | 7,67 | 8,26 | 0,20 | |
| | 6 meses | 12 | 8,00 | 8,03 | 7,19 | 8,58 | 0,40 | |
| | 9 meses | 12 | 6,68 | 6,73 | 6,22 | 7,08 | 0,24 | |
| | 12 meses | 12 | 6,45 | 6,48 | 5,83 | 7,37 | 0,51 | |
| | 18 meses | 12 | 6,56 | 6,66 | 5,37 | 7,26 | 0,54 | |
| | 24 meses | 12 | 6,88 | 6,88 | 6,88 | 6,88 | 0,001 | <0,001 |

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

| Grupos comparados (Vol[glom]) | Valor de p |
|----------------------------------|------------|
| 3 x 6 | 0,792 |
| 3 x 9 | <0,001 |
| 3 x 12 | <0,001 |
| 3 x 18 | <0,001 |
| 3 x 24 | <0,001 |
| 6 x 9 | <0,001 |
| 6 x 12 | <0,001 |
| 6 x 18 | <0,001 |
| 6 x 24 | <0,001 |
| 9 x 12 | 0,144 |
| 9 x 18 | 0,457 |
| 9 x 24 | 0,178 |
| 12 x 18 | 0,467 |
| 12 x 24 | 0,006 |
| 18 x 24 | 0,039 |

APÊNDICE 10 - DADOS DAS DOSAGENS DE ESTRESSE OXIDATIVO

| Time | Lipid peroxidation | Protein Carbonylation | Non-protein | SOD activity | CAT activity | Log Lipid peroxidation | Log Protein carbonylation | Log Non-protein | Log SOD activity | Log CAT activity |
|------|--------------------|-----------------------|-------------|--------------|--------------|------------------------|---------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| 03 | 0,00198 | 0,00422 | 12,93305 | 9,65849 | 0,19653 | -2,70333481 | -2,374687549 | 1,111700957 | 0,984909234 | -0,706571146 |
| 03 | 0,00121 | 0,00165 | 6,71611 | 9,65198 | 0,05534 | -2,91721463 | -2,782516056 | 0,827117801 | 0,984616413 | -1,256960845 |
| 03 | 0,00122 | 0,0011 | 6,31466 | 9,65679 | 0,06719 | -2,913640169 | -2,958607315 | 0,800349972 | 0,984832787 | -1,172695359 |
| 03 | 0,00134 | 0,00099 | 11,80924 | 9,63587 | 0,05915 | -2,872895202 | -3,004364805 | 1,072221949 | 0,983890932 | -1,228045251 |
| 03 | 0,00145 | 0,00137 | 13,7468 | 9,64007 | 0,11175 | -2,838631998 | -2,863279433 | 1,138201614 | 0,984080187 | -0,951752468 |
| 03 | 0,00157 | 0,00223 | 12,97084 | 9,61269 | 0,08367 | -2,804100348 | -2,651695137 | 1,112968102 | 0,982844937 | -1,077430231 |
| 03 | 0,00147 | 0,00194 | 14,34553 | 9,63546 | 0,10137 | -2,832682665 | -2,71219827 | 1,156716598 | 0,983872453 | -0,994090554 |
| 03 | 0,00108 | 0,00118 | 5,69241 | 9,63283 | 0,11973 | -2,966576245 | -2,928117993 | 0,755296173 | 0,983753896 | -0,921797017 |
| 03 | 0,0026 | 0,00493 | 15,92775 | 9,61759 | 0,15783 | -2,585026652 | -2,307153081 | 1,20215443 | 0,983066259 | -0,801810443 |
| 03 | 0,00093 | 0,00143 | 6,1225 | 9,68122 | 0,06337 | -3,031517051 | -2,844663963 | 0,786928794 | 0,985930089 | -1,198116293 |
| 03 | 0,00212 | 0,00227 | 11,021 | 9,68941 | 0,06373 | -2,673664139 | -2,643974143 | 1,042221002 | 0,986297333 | -1,195656082 |
| 03 | 0,00263 | 0,00342 | 9,15858 | 9,71137 | 0,1418 | -2,580044252 | -2,465973894 | 0,961828143 | 0,987280501 | -0,848323769 |
| 06 | 0,00212 | 0,00718 | 15,25402 | 7,16869 | 0,76442 | -2,673664139 | -2,143875556 | 1,183384311 | 0,8554398 | -0,116667959 |
| 06 | 0,00223 | 0,00808 | 33,82623 | 9,08804 | 0,66842 | -2,651695137 | -2,092588639 | 1,529253598 | 0,95847023 | -0,174950564 |
| 06 | 0,00187 | 0,01024 | 46,87708 | 10,93085 | 1,17042 | -2,728158393 | -1,989700043 | 1,670960551 | 1,038653935 | 0,068341734 |
| 06 | 0,00219 | 0,00769 | 21,6402 | 8,32272 | 0,97308 | -2,659555885 | -2,11407366 | 1,33526127 | 0,920265284 | -0,120760718 |
| 06 | 0,00219 | 0,0079 | 13,5583 | 13,22521 | 0,59008 | -2,659555885 | -2,102372909 | 1,132205239 | 1,121402577 | -0,229089105 |
| 06 | 0,00215 | 0,01013 | 17,85453 | 11,75128 | 0,8805 | -2,66756154 | -1,994390555 | 1,251748422 | 1,070085174 | -0,05527064 |
| 06 | 0,00217 | 0,00709 | 29,34545 | 10,08315 | 0,59717 | -2,663540266 | -2,149353765 | 1,467540774 | 1,003596228 | -0,223902018 |
| 06 | 0,00234 | 0,00828 | 27,04013 | 8,03909 | 0,68583 | -2,630784143 | -2,081969663 | 1,432008775 | 0,905206891 | -0,163783522 |
| 06 | 0,00211 | 0,00769 | 17,19084 | 8,90994 | 0,66725 | -2,675717545 | -2,11407366 | 1,235297098 | 0,949874779 | -0,175711418 |
| 06 | 0,00153 | 0,0083 | 27,66478 | 14,08941 | 0,75092 | -2,815308569 | -2,080921908 | 1,441927221 | 1,148892807 | -0,124406329 |
| 06 | 0,00252 | 0,00823 | 15,3899 | 10,24012 | 0,75725 | -2,598599459 | -2,084600165 | 1,187235798 | 1,010305046 | -0,120760718 |
| 06 | 0,00199 | 0,00896 | 23,67775 | 6,48267 | 0,90808 | -2,701146924 | -2,04769199 | 1,374340431 | 0,811753914 | -0,041875889 |
| 09 | 0,00209 | 0,00797 | 25,38815 | 7,71684 | 0,84342 | -2,679853714 | -2,098541679 | 1,404631056 | 0,887439496 | -0,073956105 |
| 09 | 0,0021 | 0,01039 | 38,96669 | 10,89332 | 1,00892 | -2,677780705 | -1,983384452 | 1,590693516 | 1,037160262 | 0,003856731 |
| 09 | 0,0021 | 0,01037 | 38,53771 | 14,94007 | 0,96283 | -2,677780705 | -1,984221244 | 1,585885904 | 1,174352632 | -0,016450386 |
| 09 | 0,00228 | 0,01942 | 53,26779 | 9,07242 | 1,303 | -2,642065153 | -1,711750774 | 1,726464679 | 0,957723147 | 0,114944416 |
| 09 | 0,00227 | 0,00724 | 20,07704 | 13,51816 | 0,76933 | -2,643974143 | -2,140261434 | 1,302699684 | 1,130917582 | -0,113887332 |
| 09 | 0,0023 | 0,01159 | 23,74088 | 11,731 | 0,87767 | -2,638272164 | -1,935916564 | 1,375496813 | 1,069335035 | -0,056668746 |
| 09 | 0,00167 | 0,008 | 21,4015 | 0,84275 | 0,65408 | -2,777283529 | -2,096910013 | 1,330444213 | -0,074301239 | -0,18436913 |
| 09 | 0,00212 | 0,00697 | 22,37721 | 11,57011 | 1,27858 | -2,673664139 | -2,156767222 | 1,349805938 | 1,063337488 | 0,106727907 |
| 09 | 0,00208 | 0,00688 | 15,65647 | 12,19667 | 0,47042 | -2,681936665 | -2,162411562 | 1,19469385 | 1,086241273 | -0,327514222 |
| 09 | 0,00235 | 0,00898 | 31,21307 | 11,59009 | 0,92375 | -2,628932138 | -2,046723663 | 1,494336486 | 1,064086808 | -0,034445549 |
| 09 | 0,0017 | 0,00429 | 14,45547 | 13,14449 | 0,58342 | -2,769551079 | -2,367542708 | 1,160032217 | 1,11874374 | -0,234018687 |
| 09 | 0,00204 | 0,00746 | 38,65608 | 4,78839 | 0,85075 | -2,690369833 | -2,127261173 | 1,587217811 | 0,680189515 | -0,070198042 |
| 12 | 0,00235 | 0,00694 | 13,46815 | 6,49434 | 0,80533 | -2,628932138 | -2,15864053 | 1,129307945 | 0,812535022 | -0,094026122 |
| 12 | 0,00197 | 0,00613 | 23,83263 | 12,64966 | 0,85633 | -2,705533774 | -2,212539525 | 1,377171971 | 1,102078853 | -0,067358841 |
| 12 | 0,00239 | 0,00921 | 12,73239 | 12,32423 | 0,73983 | -2,621602099 | -2,03574037 | 1,104909933 | 1,090759795 | -0,130868062 |
| 12 | 0,00226 | 0,00742 | 20,27722 | 16,46962 | 0,5555 | -2,645891561 | -2,129596095 | 1,307008413 | 1,216683579 | -0,255315937 |
| 12 | 0,00253 | 0,00828 | 13,98609 | 11,95619 | 0,73458 | -2,596879479 | -2,081969663 | 1,145696319 | 1,077592808 | -0,1339609 |
| 12 | 0,00197 | 0,00648 | 19,9075 | 13,41185 | 0,57283 | -2,705533774 | -2,188424994 | 1,299016724 | 1,127488688 | -0,241974245 |
| 12 | 0,00246 | 0,00739 | 11,18256 | 10,33726 | 0,41125 | -2,609064893 | -2,131355562 | 1,048541237 | 1,01440544 | -0,385894089 |
| 12 | 0,0023 | 0,00829 | 15,87324 | 11,07278 | 0,75358 | -2,638272164 | -2,081445469 | 1,200665583 | 1,044256671 | -0,122870636 |
| 12 | 0,00224 | 0,00726 | 18,30705 | 15,88173 | 0,66208 | -2,649751982 | -2,139063379 | 1,262618368 | 1,200897808 | -0,179089531 |
| 12 | 0,00203 | 0,00656 | 15,68326 | 13,97788 | 0,55092 | -2,692503962 | -2,183096161 | 1,195436342 | 1,145441308 | -0,258911461 |
| 12 | 0,00183 | 0,00352 | 15,98112 | 13,91637 | 0,565 | -2,73754891 | -2,453457337 | 1,203607213 | 1,143525967 | -0,247951552 |
| 12 | 0,00232 | 0,00483 | 17,97038 | 5,03645 | 0,49975 | -2,634512015 | -2,316052869 | 1,254557261 | 0,702124527 | -0,301247197 |
| 18 | 0,00244 | 0,00196 | 11,90731 | 9,74344 | 0,08235 | -2,612610174 | -2,707743929 | 1,07581366 | 0,988712315 | -1,084336396 |
| 18 | 0,00121 | 0,002 | 9,92353 | 9,71744 | 0,05935 | -2,91721463 | -2,698970004 | 0,996666187 | 0,987551868 | -1,226579277 |
| 18 | 0,0018 | 0,00191 | 7,91093 | 9,73214 | 0,04883 | -2,744277495 | -2,718966633 | 0,898227542 | 0,988208348 | -1,311313276 |
| 18 | 0,00184 | 0,00372 | 4,65738 | 9,69149 | 0,18066 | -2,735182177 | -2,42945706 | 0,668141674 | 0,986390552 | -0,743137994 |
| 18 | 0,00165 | 0,00128 | 6,16044 | 9,74472 | 0,06245 | -2,782516056 | -2,89279003 | 0,789611732 | 0,988769365 | -1,204467557 |
| 18 | 0,0023 | 0,00692 | 15,16333 | 9,68027 | 0,0851 | -2,638272164 | -2,159893906 | 1,180794587 | 0,985887471 | -1,07007044 |
| 18 | 0,00187 | 0,0066 | 10,31696 | 9,73479 | 0,04801 | -2,728158393 | -2,180456064 | 1,013551747 | 0,988326587 | -1,318668294 |
| 18 | 0,00164 | 0,00137 | 7,5678 | 9,76229 | 0,02751 | -2,785156152 | -2,863279433 | 0,878969646 | 0,989551705 | -1,56050941 |
| 18 | 0,0033 | 0,00235 | 11,56566 | 9,71137 | 0,14389 | -2,48148606 | -2,628932138 | 1,063170421 | 0,987280501 | -0,841969387 |
| 18 | 0,00296 | 0,00204 | 12,24968 | 9,71636 | 0,11938 | -2,528708289 | -2,690369833 | 1,088124744 | 0,987503597 | -0,923068425 |
| 18 | 0,00209 | 0,00187 | 12,3669 | 9,69888 | 0,0798 | -2,679853714 | -2,728158393 | 1,092260849 | 0,986721586 | -1,097997109 |
| 18 | 0,00295 | 0,00297 | 11,71262 | 9,75256 | 0,07553 | -2,530177984 | -2,527243551 | 1,068654053 | 0,989118631 | -1,121880515 |
| 24 | 0,00018 | 0,00371 | 157,44046 | 10,64005 | 0,19816 | -3,744727495 | -2,43062609 | 2,19711635 | 1,026943669 | -0,702984006 |
| 24 | 0,0001 | 0,0017 | 47,86513 | 52,6184 | 0,07792 | -4 | -2,769551079 | 1,680019243 | 1,721137638 | -1,108351056 |
| 24 | 0,00012 | 0,00155 | 19,5854 | 30,30924 | 0,05727 | -3,920818754 | -2,809668302 | 1,291932446 | 1,481575047 | -1,242072817 |
| 24 | 0,00012 | 0,0044 | 42,98473 | 117,83149 | 0,30197 | -3,920818754 | -2,356547324 | 1,633314203 | 2,071261369 | -0,520036201 |
| 24 | 0,00026 | 0,00254 | 34,59981 | 43,00687 | 0,16612 | -3,585026652 | -2,595166283 | 1,539073714 | 1,633537836 | -0,779578078 |
| 24 | 0,00138 | 0,0033 | 51,34093 | 19,43702 | 0,17273 | -2,860120914 | -2,48148606 | 1,710463731 | 1,288629682 | -0,762632227 |
| 24 | 0,00015 | 0,00441 | 21,68278 | 13,85309 | 0,27527 | -3,823908741 | -2,355561411 | 1,336114963 | 1,141546656 | -0,560241117 |
| 24 | 0,00025 | 0,00484 | 21,30318 | 11,52326 | 0,06566 | -3,602059991 | -2,315154638 | 1,328444437 | 1,061575361 | -1,182699122 |
| 24 | 0,00029 | 0,00228 | 20,5579 | 10,23393 | 0,10229 | -3,537602002 | -2,642065153 | 1,312978749 | 1,010042442 | -0,990166821 |
| 24 | 0,00056 | 0,00662 | 32,43748 | 12,2583 | 0,45766 | -3,251811973 | -2,179142011 | 1,511047107 | 1,088430246 | -0,339457044 |
| 24 | 0,00014 | 0,00254 | 37,03276 | 13,90238 | 0,24104 | -3,853871964 | -2,595166283 | 1,568586081 | 1,143089155 | -0,617910881 |
| 24 | 0,00052 | 0,00348 | 26,42108 | 9,24917 | 0,28453 | -3,283996656 | -2,458420756 | 1,421950566 | 0,966102762 | -0,545871936 |

ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 463

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

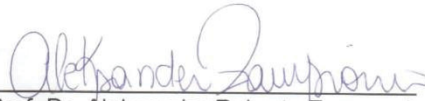
PROCESSO: 23075.032620/2010-10

APROVADO: 17/08/2010 – R.O. 07/2010

TÍTULO: Avaliação anátomo-fisiológica do envelhecimento urogenital masculino

AUTORES: Rogério de Fraga, Édison Luiz P. Farias, Djanira Veronez, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Marta Margarete Cestari, Helena Cristina Silva de Assis, Francisco Filipak Neto, Alanna Silva Huk, Larissa Remonti Bessani

DEPARTAMENTO: Anatomia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA